

Rasvan ja luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen transfektiotekniikoiden testaus

Ida Partanen

Pro gradu- tutkielma

Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

Tampereen yliopisto

Pro Gradu-tutkielma

Paikka:	Tampereen yliopisto
Tekijä:	Ida Maria Partanen
Otsikko:	Rasvan ja luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen transfektiotekniikoiden testaus
Sivumäärä:	75
Ohjaaja:	FT Sari Vanhatupa
Tarkastajat:	Apulaisprofessori Heli Skottman ja FT Sari Vanhatupa
Aika:	Kesäkuu 2018

Tiivistelmä

Tausta ja tavoitteet: Mesenkymaalisia kantasoluja käytetään kudosteknologian lääketieteellisiin sovelluksiin. Aikuisen mesenkymaalisista kantasoluista eniten tutkittuja ovat luuytimen kantasolut, mutta viime aikoina rasvan kantasolujen käyttö on yleistynyt niiden helpomman saatavuuden vuoksi. Työn tarkoituksena oli testata ja optimoida eri transfektiotekniikoita rasvan ja luuytimen kantasoluilla. Transfektiioon käytettiin Actin Chromobody -TagGFP plasmidia ja pmaxGFP plasmidia. Actin Chromobody-plasmidin sisältämän V_{HH} sekvenssin tuottama proteiini sitoutuu solujen aktiinitukirankaan, jolloin proteiinin fluoresoiva osa värjää koko tukirangan vihreäksi. pmaxGFP-plasmidin tuottama proteiini puolestaan sitoutuu epäspesifisesti soluelimiin ja värjää ne myös vihreiksi fluoresoivan proteiinin avulla.

Menetelmät: Työssä on käytetty neljää transfektiomenetelmää cDNA-plasmidin siirtoon mesenkymaaliin kantasoluihin: FuGENE HD reagenssia, Lipofectamine3000 transfektioreagenssia, kalsiumfosfaattisaostusta ja elektroporaatiota. Menetelmien onnistumista seurattiin fluoresenssimikroskoopilla ja analysoimalla kvalitatiivisesti vihreällä fluoresoivien solujen määrää kasvustossa. Lisäksi työssä oli mukana siRNA-transfektion testaus, jossa kohteeksi valittiin CIP2A-proteiini. siRNA-transfektion onnistumista tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla sekä analysoimalla proteiinin tasoja Western blot- menetelmällä. Rasvan ja luuytimen kantasoluja kasvatettiin niille tyypillisessä peruskasvatusmediumissa. Päivää ennen transfektion suorittamista mesenkymaaliset kantasolut maljattiin 24-kuoppalevyille. Transfektiota suoritettiin seuraavana päivänä ja mikroskooppianalyysit sekä Western blot-analyysi 48 tunnin päästä transfektiosta.

Tulokset: Transfektiomenetelmien onnistuminen vaihteli eri solunäytteiden välillä huomattavasti. Kaikilla menetelmillä saatiin transfektoitua soluja, mutta paras tehokkuus saavutettiin sähkövirtaan perustuvalla elektroporaatiolla. Sekä rasvan että luuytimen kantasoluilla siRNA transfektion tehokkuus havaittiin erittäin hyväksi, sillä CIP2A-proteiinin tasot putosivat siRNA käsittelyn jälkeen n. 93-100 prosentilla verrattuna scrambled siRNA vertailunäytteisiin.

Johtopäätökset: Menetelmien avulla saatiin transfektoitua sekä rasvan että luuytimen kantasolutyyppisiä vaihtelevalla menestyksellä. Transfektion onnistumiseen vaikutti sekä menetelmä että solutyyppi. Molemmilla testatuilla kantasolutyypeillä elektroporaatio ja Lipofectamine3000 reagenssi toimivat parhaiten. Kalsiumfosfaattisaostus ja FuGENE HD menetelmät vaativat vielä optimointia, jotta niiden avulla transfektiota onnistuisi tehokkaammin.

Master's Thesis

Place: University of Tampere
Author: Ida Maria Partanen
Title: Testing of transfection methods for adipose-derived and bone marrow derived mesenchymal stem cells
Pages: 75
Supervisor: PhD Sari Vanhatupa
Reviewers: Associate professor Heli Skottman and PhD Sari Vanhatupa
Date: June 2018

Abstract

Background and aims: Mesenchymal stem cells are used for medical applications in tissue engineering. Bone marrow stem cells are the most studied adult stem cells, but recently adipose derived stem cells have become more common because of their easier availability. The aim of this study was to test and optimize different transfection techniques for adipose and bone marrow stem cells. Actin Chromobody-GFP plasmid and pmaxGFP plasmid were used for transfection. The protein produced by the V_HH sequence of Actin Chromobody plasmid binds to the actin cytoskeleton and the fluorescent part of the protein stains it green. The protein produced by pmaxGFP plasmid binds unspecifically to cell organs and also stains them green with a fluorescent protein.

Methods: Four transfection methods were used for cDNA plasmid transfer into mesenchymal stem cells in this study: FuGENE HD reagent, Lipofectamine3000 transfection reagent, calcium phosphate and electroporation. The success of the methods was examined under a fluorescence microscope and by analyzing qualitatively the amount of green fluorescent cells in the culture. In addition, one siRNA transfection method was also tested, with CIP2A protein as the target. The success of siRNA transfection was examined by fluorescent microscopy and by analyzing the protein levels with Western blot method. The adipose and bone marrow stem cells were cultured in a medium typical for them. One day before transfection the mesenchymal stem cells were plated on a 24-well plate. Transfection was performed the following day and the microscopy analysis and Western Blot analysis were performed 48 hours after transfection.

Results: The success of transfection methods varied considerably between different cell samples. All methods were capable of transfecting cells, but the best efficiency was achieved with electroporation based on electric current. In adipose and bone marrow stem cells the efficacy of siRNA transfection was found to be very good because the levels of CIP2A protein were reduced after the siRNA treatment for about 93 to 100 percent compared to the scrambled siRNA reference samples.

Conclusions: The methods have provided transfection of both stem cells types with varying success. Both method and cell type affected the transfection success. For both tested stem cells types electroporation and Lipofectamine3000 reagent worked best. Calcium phosphate and FuGENE HD methods require further optimization, so that transfection would be more efficient.

Alkusanat

Tämä pro gradu-tutkielma on tehty marraskuu 2016-toukokuu 2018 välisenä aikana aikuisen kantasoluryhmässä BioMediTechillä bio- ja lääketieteen tiedekunnassa Tampereen yliopistossa. Ensimmäisenä haluan kiittää Susanna Miettistä, kun olen saanut mahdollisuuden tehdä pro gradutyöni aikuisen kantasoluryhmässä. Suuret kiitokset ohjaajalleni Sari Vanhatuvalle, sillä hän on auttanut ja neuvonut erittäin paljon käytännön työskentelyssä laboratoriossa ja kirjoitusprosessissa. Sari on kärsivällisesti vastannut lukuisiin kysymyksiin ja ohjeistanut hyvin koko projektin ajan todella paljon. Olen ollut kiitollinen saadessani työskennellä ”meseryhmässä”, missä minut on otettu hyvin vastaan ja olen kysyttäessä saanut nopeasti ohjeistusta. Kiitokset erityisesti käytännön työssä laboratoriossa auttaneille Anna-Maija Honkalalle ja Sari Kalliokoskelle.

Lisäksi olen kiitollinen Terolle hänen neuvoistaan ja kannustuksestaan kirjoitusprosessissa. Koko tämän projektin aikana myös vanhemmat, ystävät ja läheiset ovat kannustaneet minua paljon ja olen siitä heille hyvin kiitollinen. Vaativan gradutyön vastapainoksi vilkkaat koiranpennut ja aktiivinen harjoittelu uimahypyjen parissa ovat auttaneet jaksamaan arjessa.

Tampere, Kesäkuu 2018

Ida Partanen

Lyhenteet

ASC	Adipose derived stem cells
BSA	Bovine serum albumin
BMSC	Bone marrow stem cell
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Kalsiumfosfaattisaostus
CIP2A	Cancerous inhibitor of PP2A
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DBPS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMEM/F-12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12
ECL	enhanced luminol-based chemiluminescent substrate (piparijuuriperoksidaasisubstraatti)
FA	Fokaaliadheesio
FAK	Fokaaliadheesio kinaasi
GFP	Green fluorescent protein
hASC	Human adipose stem cells
hBMSC	Human bone marrow stem cell
HBS	Hepes buffered saline
hMSC	Human mesenchymal stem cells
HRB	The enzyme horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi
HS	Human serum
IgG	Immunoglobuliini G vasta-aine
iPSC	Induced pluripotent stem cells
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymal stem cell
PFA	Paraformaldehyde
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RT	Room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Concentrated tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline, 0,1 % tween

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuuskatsaus.....	3
2.1 Kantasolut.....	3
2.2 Rasvan ja luuytimen kantasolut.....	4
2.3 Kantasolujen eristys ja karakterisointi.....	5
2.4 Solun tukiranka ja fokaaliadheesiot	6
2.5 Actin-Chromobody-GFP ja pmaxGFP plasmidi	10
2.6 Solujen transfektio.....	12
2.6.1 FuGENE transfektiomenetelmä	14
2.6.2 Lipofectamine transfektiomenetelmä	15
2.6.3 Kalsiumfosfaattisaostus menetelmä	16
2.6.4 Elektroporaatio	18
2.6.5 siRNA-transfektio.....	20
2.6.6 Western blot.....	21
3. Tutkimuksen tavoitteet	24
4. Materiaalit ja menetelmät.....	25
4.1 Rasvan ja luuytimen kantasolujen kasvatus	25
4.2 Solujen fiksaaminen ja värjääminen.....	26
4.3 Solujen transfektio FuGENE-menetelmällä	27
4.4 Solujen transfektio Lipofectamine-menetelmällä	27
4.5 Solujen transfektio kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä	28
4.6 Solujen transfektio elektroporaatio-menetelmällä.....	28
4.7 Solujen siRNA-transfektio	29
4.8 Western Blot.....	30
5. Tulokset	31
5.1 FuGENE transfektiomenetelmän tulokset	31
5.2 Lipofectamine transfektiomenetelmän tulokset.....	36
5.3 Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmän tulokset	43
5.4 Elektroporaatiomenetelmän tulokset	48
5.5 siRNA menetelmän tulosten esittäminen Western blottauksen avulla	56
5.6 siRNA-transfektioimentelmän tulokset.....	58
6. Pohdinta	63
6.1 FuGENE reagenssin toimivuus transfektiossa	63

6.2 Lipofectamine reagenssin toimivuus transfektiossa	65
6.3 Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmän toimivuus transfektiossa.....	67
6.4 Elektroporaation toimivuus transfektiossa	69
6.5 siRNA menetelmän toimivuus transfektiossa	71
6.6 siRNA-transfektion toimivuuden tarkistus Western blottauksella.....	73
6.7 Yleinen pohdinta.....	74
7. Johtopäätelmät.....	75
8. Lähteet.....	76

1. Johdanto

Mesenkymaalisia kantasoluja (MSC) sekä niiden käyttömahdollisuuksia on laajasti tutkittu kohteena kudosteknologia sekä kantasolulähtöiset soluterapiat. Mesenkymaalisten kantasolujen suurin etu on saatavuus aikuiselta luovuttajalta ja niiden kyky uusiutua sekä erilaistua useiksi kudostyypeiksi, kuten esimerkiksi luuksi, rustoksi tai luustolihasoluiksi. Aikuisen kantasolut toimivat uudistavina soluina kudovaurioissa. (Cheng ym. 2017, Hu ym. 2018, Vériter ym. 2015) Luuytimen kantasoluja (BMSC) on käytetty jo 50 vuoden ajan, mutta viime aikoina myös rasvan kantasolujen (ASC) käyttö tutkimuksissa on lisääntynyt. Rasvan kantasolujen eristys on huomattavasti helpompaa ja saanto runsaampaa verrattuna luuytimen kantasoluihin (Hu ym. 2018). Rasvan kantasolujen etuina ovat myös hyvä osteogeenisuus ja kyky edistää vaurioituneen kudoksen paranemista ja verisuoniston syntymistä vaurioalueelle. Rasvan kantasoluja hyödynnetään erityisesti luu- ja ihovaurioiden korjaushoitoihin (Vériter ym. 2015). Aikuisen kantasolujen yksi merkittävä etu käytössä on, että solujen luovuttaja voi olla sama henkilö kuin vastaanottaja, jolloin vieraan kudoksen hylkimisongelmaa ei tule (Arjmand ym. 2017, Sándor ym. 2014).

Kantasolujen käytön lähtökohtana voi esimerkiksi olla luukudokseen vaikuttava krooninen sairaus, luusyöpä tai vakava trauma. Esimerkiksi osteoporoosi on maailmanlaajuisesti yleistynyt luusairaus joka aiheuttaa suuret määrät leikkauksia vaativia luumurtumia (pelkästään vuosien 2006-2007 aikana n. 8,9 miljoonaa murtumaa). Mesenkymaalisia kantasoluja on mahdollista käyttää tulevaisuudessa osteoporoosin hoitoon, mutta menetelmän kehittäminen vaatii edelleen paljon tietoa niiden molekulaarisesta mekanismista osteoporoosin kehittymisessä. (Hu ym. 2018)

Fysikaaliset ja kemialliset olosuhteet vaikuttavat solun tukirangan kautta solujen muotoon, kasvamiseen ja erilaistumiseen. Tämä on yksi syy miksi halutaan päästä tarkastelemaan aktiinitukirangan toimintaa elävissä soluissa (Mathieu & Lobo 2012). Aktiinitukiranka on yhteydessä soluväliaineeseen fokaaliadheesioiden (FA) kautta. Fokaaliadheesiot ovat suuria proteiini-komplekseja jotka toimivat liitoskohtina solun ja soluväliaineen välillä. Niiden kautta kulkeutuvat soluväliaineen ja solujen väliset signaalit, jotka vaikuttavat erityisesti solusykliin ja liikkuvuuteen (Zaidel-Bar ym. 2004). Solun muoto ja lujuus ovat yhteydessä toisiinsa ja niiden on osoitettu liittyvän aktiinitukirangan säätelyyn sekä solun mekaanisiin ominaisuuksiin (Mathieu & Lobo 2012).

Transfektion avulla voidaan manipuloida solujen ulkomuotoa ja toimintaa ja sitä kautta tarkastella paremmin solujen toimintamekanismeja. Kemiallisten ja fysikaalisten transfektio-menetelmien etuihin kuuluvat hyvin matala immunologinen toksisuus, rakenteellinen joustavuus kemiallisissa yhdisteissä, olosuhteiden muokattavuus sekä edullinen hinta. (Prieto ym. 2016, Sringer & Yue 2013) Tässä työssä transfektoitiin rasvan ja luuytimen kantasoluja ja manipuloinnin kohteeksi on valittu solujen aktiinitukiranka. Transfektoitavien plasmidien avulla solujen aktiinitukiranka saadaan näkyviin fluoresoivan markkeriproteiinin (GFP) ansiosta ja työn onnistumista voidaan tarkastella fluoresenssimikroskoopin avulla.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kantasolut

Työssä käytettävät rasvan kantasolut ovat eristetty Tampereen Yliopistollisessa sairaalassa tehdyistä leikkauksista saadusta rasvakudoksesta. Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettinen toimikunta (R15161) on antanut luvan käyttää saatuja rasvasoluja tutkimukseen.

Kantasolut pystyvät jakaantumaan ja erilaistumaan uudeksi solutyypiksi. Mesenkymaaliset kantasolut ovat mesodermaalista alkuperää. Nämä monikykyiset kantasolut pystyvät erilaistumaan useiksi eri kudostyypeiksi, mutta eivät pysty muodostamaan kokonaan uutta elintä. Mesenkymaaliset kantasolut voivat erilaistua luu-, rusto-, jänne-, lihas- ja rasvasoluiksi. Kantasoluja esiintyy aikuisellakin eri kudoksissa pieniä määriä, mutta parhaiten niitä voidaan eristää rasvakudoksesta tai luuytimeistä. Eristettyjä soluja voidaan sitten kasvattaa tietynlaisissa olosuhteissa ja erilaistaa eri solutyypiksi kasvutekijöiden avulla. (Cheng ym. 2017, Ciuffi ym. 2017, Hu ym. 2018, Pérez-Silos ym. 2016, Vériter ym. 2015)

Lähes kaikki kykyisiä (pluripotentit) kantasoluja esiintyy runsaasti varhaisessa alkiossa ja niistä muodostuu sikiön eri kudokset ja elimet. Kantasoluja esiintyy myös aikuisella yksilöllä melko paljon, mutta niiden erilaistumiskyky on rajoittunut verrattuna alkion kantasolujen erilaistumiskykyyn. Aikuisen kantasolut toimivat aikuisessa yksilössä normaalissa kudonsvaurioiden korjaamisessa, sillä erikoistuneet solut kuten esimerkiksi luusolut eivät pysty enää jakaantumaan. Kudoksissa esiintyvät kantasolut voivat erilaistua eri solutyypeiksi riippuen ympäristön signaaleista. (Dai ym. 2016, Vériter ym. 2015) Kantasoluilla on kyky jakaantua loputtomasti tietynlaisissa olosuhteissa. Kantasolujen jakaantuminen on epäsymmetristä, sillä mitoosissa muodostuu toinen samanlainen tytärsolu ja toinen erilaistunut solu. Kantasolut voidaan jakaa neljään ryhmään niiden erilaistumiskyvyn mukaan. Kaikkikykyiset kantasolut, eli totipotentit voivat muodostaa kokonaan uuden yksilön. Pluripotentit voivat muodostua kaikiksi alkiokerroksen soluiksi, mutta niistä ei voi enää muodostaa istukkaa. Monikykyiset kantasolut, joita kutsutaan nimellä multipotentit kantasolut voivat erilaistua useiksi solutyypeiksi riippuen mistä alkiokerroksesta ne ovat peräisin. Vain yhdenlaisiksi solutyypeiksi jakaantuvia kantasoluja kutsutaan unipotentteiksi. Kantasoluja voidaan eristää blastokystasta, eli monisoluisesta alkiorakkulasta, sikiöstä, napanuorasta ja aikuisesta yksilöstä (Dai ym. 2016). Mitä varhaisemmassa vaiheessa sikiö on, sitä monikykyisempiä kantasolut ovat. Napanuorasta eristetyt kantasolut katsotaan kuuluvan jo aikuisen kantasoluihin, myös lapsivedestä on mahdollista eristää kantasoluja. Aikuiselta on myös mahdollista eristää kantasoluja tai somaattisen linjan soluja ja takaisinohjelmoida keinotekoisesti ne jälleen pluripotentteiksi kantasoluiksi, niistä käytetään

lyhennettä iPSC (induced pluripotent stem cells). iPSC-soluja on helposti saatavilla ja niiden suhteen ei ole eettisiä ongelmia, sillä ne saadaan aikuisilta vapaaehtoisilta luovuttajilta. (Hanna ym. 2017)

Mesenkymaalisilla kantasoluilla on alhainen immunogeeninen vaste ja siksi ne ovat paljon käytettyjä soluja tutkimuksissa. Solujen jakaantumiskerrat halutaan pitää kantasolututkimuksissa mahdollisimman pieninä, sillä jakaantumiskertojen lisääntyessä solujen kyky erilaistua voi heikentyä ja samalla niiden kantasolumaisuus vähenee. Solujen erilaistumiskykyyn vaikuttavat myös luovuttajan ikä, sukupuoli ja jossakin määrin terveydentila. Kantasolut voivat jossakin määrin ikääntyessä osittain kadottaa erilaistumiskykynsä ja monilinjaisen erilaistumiskapasiteetin. (Boyette & Tuan 2014, Prieto ym. 2016).

2.2 Rasvan ja luuytimen kantasolut

Aikuisen kantasolujen käyttö on eettisesti paljon helpompaa kuin sikiön kantasolujen käyttö. Toisaalta sikiön kantasolut ovat monikykyisempiä erilaistumaan eri solutyypeiksi. Aikuisen kantasoluja voidaan käyttää paljon varsinkin korjaavan kudosteknologian sovelluksissa. (Ciuffi ym. 2017, Dai ym. 2016). Kantasolujen käyttöä tutkimuksissa rajoittaa niiden rajallinen saatavuus ja solujen mukana tulevat haittavaikutukset. Mesenkymaalisten kantasolujen määrä luuytimessä vähenee huomattavasti ikääntyessä, jolloin aikuisista eristettyjä kantasoluja joudutaan monistamaan enemmän solukasvatuksessa. (Bang ym. 2016, Palmer & Kirkland 2016)

Luu on eniten käytetty kudossiirre ja vuosittain pelkästään Euroopassa tehdään yli miljoona kirurgista luunsiirto-operaatiota. Vakavan luumurtuman korjaamatta jättäminen voi johtaa jopa raajan amputaatioon, siksi tarvitaan ratkaisuja pidempiaikaiseen luuvaurioiden hoitoon. Kudosteknologia on erityisen kehittynyt juuri luukudoksen kohdalla ja se johtuu osittain siitä, että luukudos luonnostaan korjaa itse itseään erittäin tehokkaasti. Kuitenkaan luukudos ei pysty korjaantumaan itsestään, jos kudoksen vaurio on liian suuri (yli 10 % vaurio). Luukudosteknologia on jatkuvasti kehittyvä ala, mutta siinä on edelleen haasteita, jotka vaativat lisätutkimusta. Luun transplantaatiossa voi tapahtua kudoksen hypoksiaa, eli solut eivät saa riittävästi happea tai kudoksen verisuonitus ei ole riittävä. Kasvutekijöiden pitoisuus biomateriaali ja solusiirteissä on oltava tarkasti säännöstelty, sillä liian alhainen pitoisuus ei aiheuta haluttua vastetta ja liian suuri pitoisuus voi aiheuttaa kudokseen tulehduksen. Lisäksi jatkuvan kehityksen kohteena on saada laboratorio-olosuhteet vastaamaan mahdollisimman hyvin kudoksen biologisia olosuhteita. (Bhattacharya ym. 2016) Luuytimen kantasolujen eristys ihmisestä on kivulias toimenpide, joka vaatii aina kirurgisen leikkauksen, lisäksi näytteiden vaihtelevuus aiheuttaa haasteita jatkotoimenpiteitä varten. Siitä huolimatta luuytimen

kantasolunäytteet ovat toistaiseksi eniten käytettyjä mesenkymaalisia kantasoluja tutkimuksissa ja niillä on paljon pidempi käyttöhistoria kuin rasvan kantasoluilla. (Ciuffi ym. 2017, Dai ym. 2016)

Rasvan kantasoluja on helpompi eristää kuin luuytimen kantasoluja, sillä rasvan kantasoluja saadaan eristettyä ihonalaisesta rasvakudoksesta. Saatavuuden ansiosta rasvan kantasolut ovat yleistyneet paljon mesenkymaalisten kantasolujen tutkimuksissa. Rasvan kantasolujen on raportoitu olevan parempia parakriinisessa toiminnassa ja verisuonten muodostumisessa kuin luuytimen kantasolujen. (Bang ym. 2016, Dai ym. 2016, Roato ym. 2016) Rasvan kantasolujen pitkäaikaisista vaikutuksista ei ole vielä paljon tietoa saatavilla ja lisäksi niiden pitkäaikainen säilytys on tärkeässä osassa solujen käytössä kliinisissä tutkimuksissa. (Dai ym. 2016). Rasvan kantasolujen avulla tehtäviin kliinisiin sovelluksiin kuuluu mm. luukudosten korjaaminen, pehmytkudoksen uudistaminen, iskeemiset vammat ja immuunisairaudet, rasvan kantasoluja voidaan jopa käyttää sydänperäisiin sairauksiin hoidon apuna. (Ciuffi ym. 2017, Frese ym. 2016) Regeneratiivisissa lääketieteen sovelluksissa voidaan korvata vaurioitunutta kudosta uudella, parantaa kudoksia ja antaa terapeuttisia hoitoja useille sairauksille. (Ciuffi ym. 2017, Dai ym. 2016, Hanna ym. 2017). Yksi tärkeä tutkimuksen aihe on myös mesenkymaalisten rasvan kantasolujen kiinnittyminen käytettäviin biomateriaaleihin. Biomateriaalin ja solujen välisiä vuorovaikutuksia halutaan tarkastella, sillä se vaikuttaa solujen jakaantumiseen, erilaistumiseen ja liikkumiseen. Erityisesti tätä hyödynnetään uudistavan lääketieteen hoidoissa, jossa soluja siirretään ihmiseen jonkin biomateriaalin sisällä. (Dai ym. 2016).

2.3 Kantasolujen eristys ja karakterisointi

Mesenkymaalisten kantasolujen standardointi on haastavaa, sillä ne koostuvat useista solutyypeistä ja niiden ominaisuudet voivat vaihdella riippuen kudoslähteestä ja eristysmenetelmästä. Ihmisen mesenkymaalisille kantasoluille (hMSC) ei ole yhtä tiettyä biomarkkeria, jolla ne voitaisiin tunnistaa, mutta sen sijaan niiden tunnistaminen onnistuu käyttäen useita biomarkkereita. Mesenkymaalisten kantasolujen täytyy vähintään täyttää seuraavat vaatimukset, jotta niitä voidaan kutsua mesenkymaalisiksi kantasoluiksi, tai jotta niitä voidaan käyttää tutkimuksissa: kyky tarttua ja kasvaa muovisella alustalla, kyky uusiutua itsestään, mahdollisuus erilaistua luuksi, rustoksi ja rasvaksi ja ilmentää tietyt pintamarkkerit, jotka on listattu taulukossa 1. Kriteerit on määritelty erillisessä mesenkymaalisiin kantasoluihin erikoistuneessa kansainvälisessä komiteassa (the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy). (Ciuffi ym. 2017, Pérez-Silos ym. 2016).

Luuytimen kantasoluja voidaan eristää luuydin-näytteistä. Toimenpide on haasteellinen, usein potilaalle kivulias ja luuytimen kantasoluja on näytteissä vain hyvin vähän (0.001-0.01 %) (Ciuffi ym. 2017, Pérez-Silos ym. 2016). Luuytimen ja rasvakudoksen lisäksi mesenkymaalisia kantasoluja voidaan myös eristää muistakin kudoksista kuten esimerkiksi rustosta, jänteistä, luusta ja napanuorasta. Rasvakudoksen etuina on helppo saatavuus ja käytettävyys terapeuttisissa sovelluksissa ilman hylkimisen vaaraa.

Kantasoluja voidaan eristää kudoksesta mekaanisesti tai kemiallisesti entsyymien avulla. Mekaanisessa eristysmenetelmässä kudoksesta jauhetaan pieniksi palasiksi, jonka jälkeen rasvakudos erotetaan sentrifugoinnin ja suodatuksen (100-µm huokoskoolla) avulla (Patrikoski ym. 2014). Kemiallisessa menetelmässä puolestaan entsyymit hajottavat soluväliainetta solujen ympäriltä, jonka jälkeen irrotetut solut eristetään uudelle kasvualustalle. Kudoksesta eristettävien solujen määrään vaikuttaa luovuttajan ikä, sukupuoli, kudoksen keräysmenetelmä ja kasvatusolosuhteet. (Mushahary ym. 2017)

Taulukko 1. Mesenkymaalisista kantasoluista testattavat pintamarkkerit

solutyyppi	positiiviset pintamarkkerit	negatiiviset pintamarkkerit
Luuytimen kantasolu	SH2, SH3, CD29, CD44, CD49e, CD105, CD106, CD120a, CD124	CD34, CD45, CD19, CD3, CD31, CD11b, HLA-DR
Rasvan kantasolu	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-1, HLA-ABC	CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133, SSEA4, CD106, HLA-II, HLA-DR

Lähde: (Mushahary ym. 2017)

2.4 Solun tukiranka ja fokaaliadheesiot

Solutukiranka antaa solulle mekaanisen suojan, solun muodon, ja on tärkeässä osassa solun jakaantumisessa ja liikkeessä. Lisäksi solutukirangan proteiinien ansiosta tapahtuu viestintää solujen välillä ja solut voivat kiinnittyä solun ulkoiseen soluväliaineeseen. (Alberts ym. 2009) Solutukirangalla on suuri merkitys mekaanisessa aistimuksessa ja mekanotransduktiossa. Erityisesti kantasoluilla solutukirangan proteiinit yhdessä integriinien ja mekaanisen ärsykkeen kanssa voivat vaikuttaa solun ulkomuotoon, jakaantumiseen ja erilaistumiseen. Aktiinitukiranka näyttäisi olevan yhteydessä mesenkymaalisten kantasolujen muotoon ja erilaistumiseen. (Mathieu & Lobo 2012) Tässä on myös yksi syy siihen miksi kantasoluilla halutaan tarkastella aktiinitukirangan toimintaa ja vaikutusta. Solutukiranka muodostuu kolmenlaisista proteiineista: mikrofilamenteista, välikokoisista filamenteista ja mikrotubuleista.

Aktiini antaa suurimman lujuuden solulle. Mikrofilamentteja sanotaan myös aktiinifilamenteiksi, sillä ne muodostuvat yhdistyneistä aktiini-monomeereista. Solutukirangan filamenteista aktiinisäikeet ovat kaikista ohuimpia, niiden halkaisija on noin 7 nm. Aktiinifilamenttien rakenne muistuttaa kaksoiskierrettä ja ne ovat suuntautuneita, eli filamenttien päät ovat erilaiset keskenään. Aktiinifilamenteilla on useita tärkeitä tehtäviä solussa. Yksi näistä tehtävistä on mahdollistaa solun liikettä yhdessä myosiinin kanssa. Esimerkiksi ihmisen lihassoluissa aktiini- ja myosiinisäikeiden liikkuminen toistensa lomiin aiheuttaa lihassupistuksen, joka puolestaan mahdollistaa kehon liikkeen yhdessä luuston kanssa. Solun jakaantumisessa aktiinifilamentit ovat tärkeässä osassa, kun mittoosin loppuvaiheessa aktiinisäikeistä muodostunut rengas erottaa kaksi tytärsolua toisistaan. Aktiinisäikeitä pitkin tapahtuu paljon solunsisäistä liikettä ja jopa organelleja voidaan siirtää aktiinisäikeitä pitkin. Aktiinifilamentit ovat tässä tapauksessa enemmänkin stabiilina rakenteena jota pitkin toiset proteiinit kuljettavat materiaalia soluissa. (Alberts ym. 2009)

Aktiinisäikeet ovat hyvin dynaamisia ja niitä puretaan ja muodostetaan jatkuvasti soluissa. Aktiinisäikeiden nopea muodostuminen ja purkaminen mahdollistavat monien solujen liikkeen, esimerkiksi valkosolut hyödyntävät aktiinisäikeitään liikkeessaan. Liikkeen lisäksi aktiinisäikeet myös antavat solulle sen muodon ja lujuuden, sillä ne sijaitsevat aivan solun ulkoreunalla solukalvon alla. Yksittäiset aktiinisäikeet ovat ohuita ja joustavia, mutta järjestäytyneinä ryhmänä tai verkkona nämä filamentit ovat hyvinkin vahvoja. Aktiinia esiintyy soluissa luonnostaan paljon, yhteensä noin 5 % solujen kaikista proteiineista (Alberts ym. 2009). Suuren aktiinipitoisuuden vuoksi aktiinitukirangan muutoksia on mahdollista tarkastella mikroskoopin avulla, sillä muutokset ovat selkeästi havaittavissa.

Välikokoiset filamentit ovat hyvin pysyviä yhdisteitä ja ne antavat yhdessä aktiinin kanssa lujuutta ja rakennetta solun muodolle. Välikokoisten filamenttien ansiosta solut kestävät mekaanista venytystä rikkoutumatta. Välikokoiset filamentit myös kiinnittävät soluelimet paikoilleen. Nämä proteiinisäikeet ovat kooltaan noin 8-10 nm ja ne voivat olla eri muotoisia riippuen proteiinalayksiköistä, joista ne ovat muodostuneet. Esimerkiksi keratiini on yksi proteiini joka muodostaa välikokoisia filamentteja. Mikrotubulukset koostuvat α - ja β -tubuliinin alayksiköistä, jotka ovat järjestäytyneet pitkänomaiseksi rakenteeksi. Kooltaan nämä proteiinisäikeet ovat solutukirangan säikeistä suurimmat ja niiden halkaisija on noin 25 nm. Myös mikrotubulukset ovat hyvin dynaamisia ja niissä tapahtuu jatkuvasti nopeita muutoksia rakenteessa. Soluissa mikrotubulukset antavat lujuutta ja suojaavat kokoonpuristumiselta. Myös mikrotubulukset osallistuvat aktiinisäikeiden tavoin solun sisäiseen vesikkeleiden kuljettamiseen. Solun

jakaantumisessa mikrotubulukset ovat tärkeässä osassa kromosomien erottamisesta toisistaan. (Alberts ym. 2009)

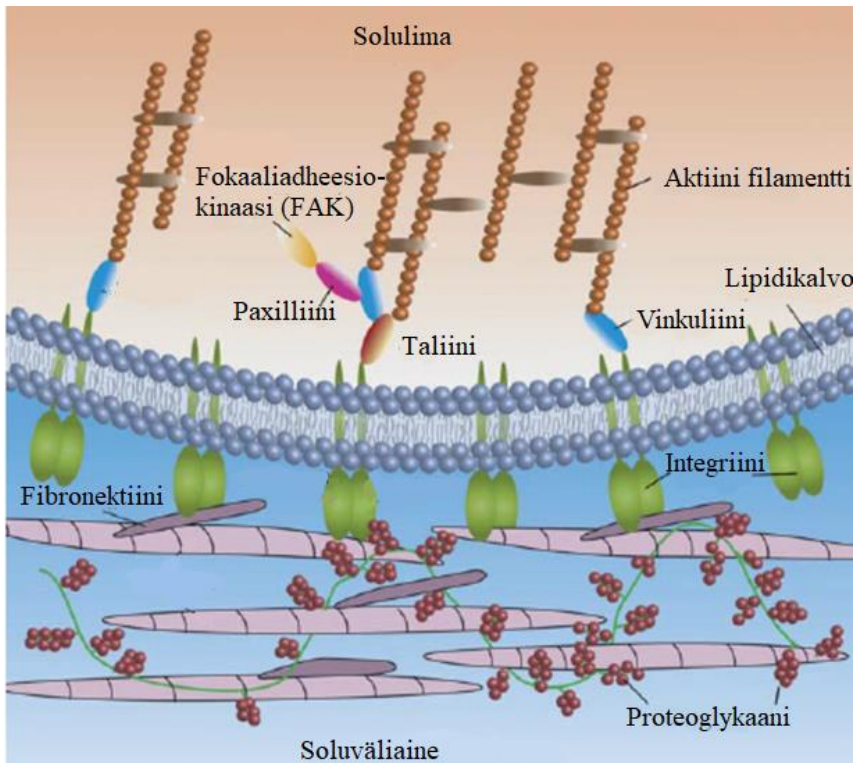
Fokaaliadheesio on hyvin laaja proteiinikompleksi, joiden kautta solut kiinnittyvät tiukasti soluväliaineeseen. Solutyypistä riippuen FA voi olla joko hyvinkin stabiili tai dynaaminen riippuen siitä ovatko solut paikallaan vai liikkeessä. Fokaaliadheesio nopeasti rakenteen muutokset mahdollistavat solujen liikkumisen soluväliainetta pitkin. Fokaaliadheesio lisäksi solut kiinnittyvät myös muilla menetelmillä soluväliaineeseen, mutta eivät yhtä vahvasti kuin fokaaliadheesio avulla. FA-proteiinit myös viestivät soluille niiden ympäristöstä ja sitä kautta vaikuttavat solun toimintaan. Solutukirangan ja fokaaliadheesioiden kautta solut ovat yhteydessä solunulkoisen ympäristön kanssa ja voivat nopeasti sopeutua ja vastata ulkoisiin ärsykkeisiin. Erityisesti aktiinitukirangan aktivoituminen on vahvasti sidoksissa fokaaliadheesioiden toimintaan. (Arous & Halban 2015, Bernabé-García ym. 2017). Fokaaliadheesiokompleksin ollessa liian voimakas se voi myös estää solujen liikettä. Solut, jotka puolestaan voivat liikkua hyödyntävät FA sidoksia paikallisesti ja hetkellisesti. Liikkuvat solut voivat kiinnittyä toisesta päästä kerrallaan ja irrottautua toisesta päästä, jolloin solut voivat joko vetää osan itsestään mukana tai työntää eteenpäin. Tällaisissa soluissa fokaaliadheesioiden rakennemuutokset täytyy olla hyvin nopeita. Solun liikkuminen myös vaatii hyvin nopeita muutoksia solun aktiinitukirangassa, kun solun muoto vaihtelee liikkeen aikana. Solutukirangan toiminta on myös yhteydessä solun muuhun toimintaan tuman kautta. Mekaaninen jännitys solun ulkokuorella voi vaikuttaa geenien ekspressioon erityisten filamenttien kautta jotka toimivat linkkinä tuman ja solutukirangan välillä. (Burridge & Guilluy 2016)

Fokaaliadheesio viestii soluille soluväliaineen tilasta ja koostumuksesta, solun pinnan fysiologisista oloista ja mekaanisesta ärsykkeestä. Fokaaliadheesiot vaikuttavat solun liikkuvuuteen, kasvuun sekä kuolemaan, solutukirangan uudelleen järjestäytymiseen ja myös geenien ilmentymiseen. On myös ehdotettu, että fokaaliadheesiot voisivat tunnistaa substraatin jäykkyyttä. On huomattu, että solut levittäytyvät paremmin jäykkien substraattien päälle kuin pehmeisiin rakenteisiin. Fokaaliadheesiot ovat suurempia jäykän substraatin läheisyydessä ja aktiinisäikeet ovat enemmän polarisoituneita ja nämä edesauttavat, että soluilla on mahdollista muodostaa luja vetovoima jäykkiin substraatteihin. Proteiinien väliset sidokset, hydrofobiset vetovoimat ja heikot ei-kovalenttiset vuorovaikutukset pitävät filamentteja kasassa solutukirangan kohdalla. (Gupta ym. 2016)

Fokaaliadheesio proteiinikompleksien toiminta on vahvasti riippuvainen monien muiden proteiinien toiminnasta kuten fokaaliadheesio kinaasi (FAK) ja integriinien aktivoinnista. FAK proteiinit liittyvät monien signaalireittien toimintaan ja sitä kautta useisiin solujen ja soluväliaineen väliseen viestintään, lisäksi kantasolujen tapauksessa myös niiden erilaistumiseen. (Arous & Halban 2015, Bernabé-

García ym. 2017, MacQueen ym. 2013, Mitra ym. 2005). Integriinit lävistävät solukalvon ja viestivät näin ollen solun aktiinitukirangan ja soluväliaineen välillä (Calderwood 2004). Yksi fokaaliadhesiokompleksin proteiineista on vinkuliini, joka on vahvasti yhteydessä solujen migraatioon eli liikkumiseen muodostamalla vahvan vetovoiman substraatin ja solun välille. Vinkuliini osallistuu olemassa olevien aktiinisäikeiden muokkautumiseen ja uusien säikeiden muodostumiseen. Lisäksi vinkuliini voi yhdistää aktiinifilamentteja toisiinsa ja on sekä solu-soluväliaine että solu-solu liitoksissa mukana. (Calderwood 2004, Bays & DeMali 2017, Brown ym. 1996) Fosforyloituneet Paxilliinit ovat proteiineja, jotka ovat osallisena useissa solun tapahtumissa, kuten esimerkiksi aktiinitukirangan uudelleen muodostumisessa solun adheesiossa ja kasvun säätelyssä. Nämä proteiinit myös ohjaavat osittain fokaaliadheesion dynamiikkaa. (Brown ym. 1996) taliini-proteiini on tärkeässä osassa fokaaliadheesion muodostumisessa. Taliini voi sitoutua suoraan aktiinisäikeisiin ja yhdistää sen näin ollen useisiin signaalointiproteiineihin. (Calderwood 2004)

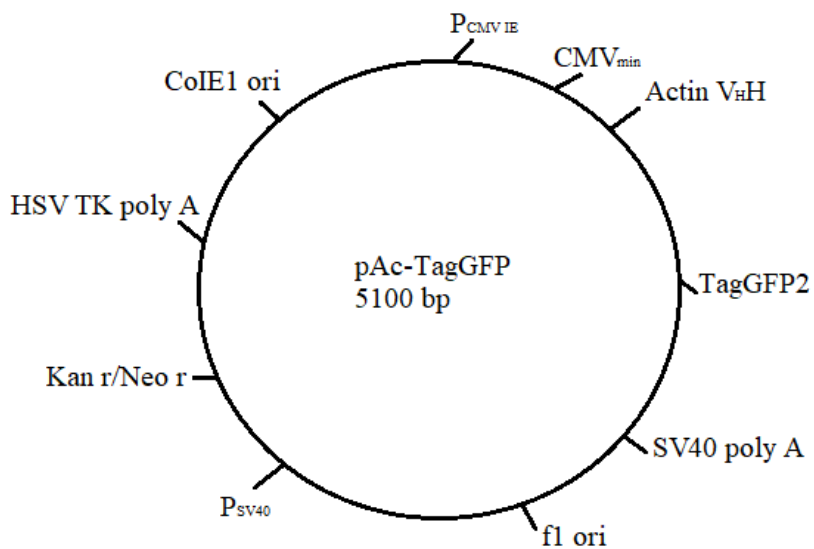
Varhaisemmat fokaaliadhesiokompleksit mahdollistavat enemmän solujen kykyä liikkua, kun taas jo pidemmälle kehittyneet kompleksit enemmänkin ankkuroivat solut tiukasti kiinni soluväliaineeseen. Fokaaliadheesion proteiinit kiinnittyvät puolestaan soluväliaineen suuriin proteiinirakenteisiin, kuten esimerkiksi fibronektiiniin, kollageeniin ja vitronektiiniin. (Beningo ym. 2001, Gardel ym. 2010) Kuva 1. näyttää fokaaliadhesiokompleksin tärkeimmät komponentit ja niiden keskeiset sijainnit.



Kuva 1. Kaavakuva fokaaliadheesiokompleksista. Kuvassa näkyvät fokaaliadheesion keskeisimmät komponentit ja niiden sijainnit toisiinsa nähden. Kuva muokattu lähteestä: Variola ym. 2010

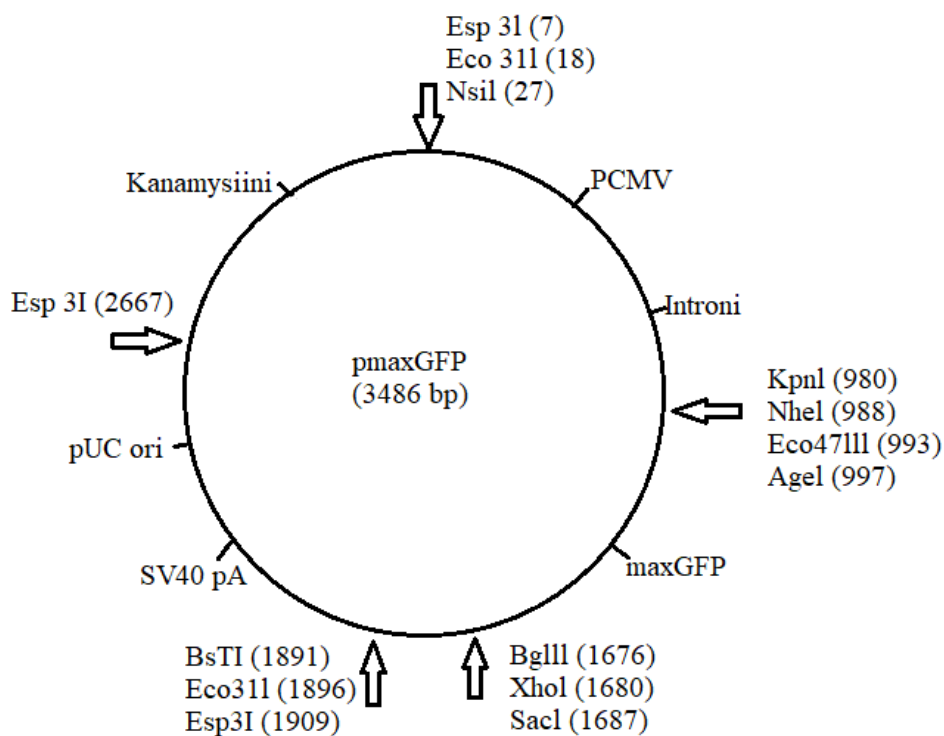
2.5 Actin-Chromobody-GFP ja pmaxGFP plasmidi

Tässä työssä on käytetty kahta erilaista transfektoitavaa DNA-plasmidia, Actin Chromobody -TagGFP (green fluorescent protein) plasmidia (pAC-TagGFP) (chromotek, Germany) ja pmaxGFP vektoria (pmaxGFP: LONZA, Technology Innovation Center, USA). Actin Chromobody -TagGFP plasmidi (TaGGFP: Evrogen) on nisäkässoluille sopiva ekspressiovektori joka koodaa solutukirangan merkkiaineen (Actin V_HH) kanssa yhdistyvää TagGFP2:sta. Plasmidissa on proteiiniekspressiota varten cytomegaloviruksen promoottori (PCMV IE), aloituskohdat SV40, ColE1 ja f1 ja polyadenylaatio-signaali (SV40 poly A). SV40 promoottorin avulla (P_{SV40}) avulla voidaan säätää Neomysiiniresistenssigeenin (Neo^r) ilmentymistä. Bakteeri promoottorin (P) alaisuudessa toimii plasmidissa mukana oleva kanamysiiniresistenssi (Kan^r), jonka avulla voidaan seuloa bakteerikasvatuksesta vain plasmidia tuottavat bakteerit. Herpes simplex viruksen (HSV) tymiinikinaasin (TK) polyadenylaatio-signaali on yhteydessä Kan^r/Neo^r geeniin. Kuvassa 2. nähdään kaaviokuva Actin Chromobody-plasmidista. Plasmidissa mukana oleva Actin V_HH osan tuottama proteiini sitoutuu transfektoidun solun aktiinitukirankaan. Transfektion onnistumista voidaan havainnoida fluoresenssimikroskoopilla, kun plasmidin sisältävien solujen aktiinitukiranka on värjäytynyt vihreäksi.



Kuva 2. Kaavakuva Actin Chromobody-plasmidista. Kuvan tiedot otettu lähteestä:
www.chromotek.com

Käytössä oleva pmaxGFP Vector (pmaxGFP) (LONZA) on eukaryoteissa tuotettu plasmidi joka mahdollistaa kloonatun DNA:n ekspressoinnin nisäkässoluissa. Kyseinen plasmidi sisältää cytomegaloviruksen promoottorin (PCMV IE), kanamysiiniresistenssigeeni, SV40 polyadenylaatio signaalin (SV40 poly A) ja maxGFP-Tag. Tämä vektori soveltuu sekä väliaikaiseen että pysyvään geenien ekspressioon. pmaxGFP plasmidi soveltuu käytettäväksi nisäkäs-soluille ja sen sanotaan soveltuvan kaikille tunnetuille transfektio-menetelmille. Kuvassa 3. on kaaviokuva pmaxGFP:n rakenteesta.



Kuva 3. Kaavakuva pmaxGFP plasmidin rakenteesta. Kuvan tiedot otettu lähteestä:

www.lonza.com

2.6 Solujen transfektio

Transfektio on biotekninen menetelmä, jossa siirretään vierasta DNA:ta tai RNA:ta soluihin. Solujen ominaisuuksia voidaan muokata viemällä soluun uutta nukleiinihappoa DNA-transfektion avulla. RNA:ta transfektoimalla voidaan puolestaan hiljentää jonkin geenin vaikutus estämällä kyseisen proteiinin tuotanto. Transfektiossa siirrettävä nukleiinihappo voidaan suojata ja siirtää solun sisään erilaisten kemiallisten kantajareagenssien avulla. Kemialliset menetelmät toimivat usein samalla periaatteella: negatiivisesti varautunut nukleiinihappo suojataan ja varaus neutraloidaan positiivisilla ioneilla tai amfifiilisellä molekyylillä, tämä kompleksi kulkeutuu solukalvon kautta esimerkiksi endosytoosin avulla sytosoliin ja sieltä DNA kuljetetaan solun tumaan. RNA:n tapauksessa vaikutus on nopeampi ja helpompi, sillä sen ei tarvitse päästä tumaan vaikuttaakseen proteiinituotannon estämiseen. (Sokolova ym. 2006).

Tässä työssä ei käsitellä DNA:n tai RNA:n kulkeutumista ja toimintaa solun sisällä, vaan tarkoituksena keskittyä menetelmiin, jolla saadaan plasmidi transfektoitua soluun. Fysikaalisia transfektio-menetelmiä on useita erilaisia ja niitä voidaan käyttää joko yhteen soluun kerrallaan tai suureen solujoukkoon yhtäaikaaisesti. Fysikaalisissa menetelmissä toimintatavat vaihtelevat, mutta

tarkoitus on saada DNA soluun mekaanisesti esimerkiksi mikroinjektiolla tai nanopartikkeleiden avulla. Yksi tehokas tapa on myös heikentää solukalvon rakennetta sähkövirralla, jolloin solukalvoon muodostuu nukleiinihapon mentäviä hetkellisiä aukkoja. Tähän työhön on valittu käytettäviksi menetelmiksi kolme kemiallista menetelmää DNA:n siirtoon: FuGENE HD, Lipofectamine3000 ja kalsiumfosfaattisaostus. Fysikaalisena menetelmänä testataan elektroporaatiota. Lisäksi työhön on otettu mukaan yksi RNA transfektio, joka toteutetaan siRNA:lla kemiallisen reagenssin avulla. siRNA:n transfektioon käytetään Lipofectamine RNAiMAX reagenssiä. siRNA-transfektion avulla estetään halutun geenin toimintaa pysäyttämällä kyseisen proteiinin tuotanto.

Transfektio on paljon käytetty työkalu, koska sillä voidaan vaikuttaa hyvin spesifisesti solujen fenotyyppiin ja toimintaan. Tässä työssä transfektiota halutaan testata kantasoluihin, joita yleisesti pidetään melko haastavina transfektoida. Virusperäiset transfektiot ovat olleet paljon käytössä niiden tehokkuuden vuoksi (tehokkuus jopa 80-90 %), mutta niiden aiheuttamia vakavia sivuvaikutuksia voivat olla rekombinaation riski, immunogeeniset reaktiot ja karsinogeenisyys. (Abdul Halim ym. 2014, Bakhshandeh ym. 2012, Ishiguro ym. 2017, Rao ym. 2015, Sokolova ym. 2006). Transfektio toteutetaan kontrolloidussa solukasvatusympäristössä. Transfektio-menetelmän kuuluu olla tehokas, mutta se ei saa vahingoittaa liikaa solujen elinkykyä tai aiheuttaa muuta häiriötä. (Guo ym. 2017) Lisäksi halutaan, että transfektio kohdistuu vain haluttuun spesifiseen proteiinin toimintaan eikä mihinkään muuhun. Transfektion suurin haaste ei ole pelkästään saada nukleiinihappo solun sisään, vaan myös saada siirrettävä molekyyli säilymään ehjänä ja estää sen hajoaminen esimerkiksi lysosomeissa. Tämä on yksi syy, miksi DNA:n määrän lisääminen ei nosta transfektiotehokkuutta. (Abdul Halim ym. 2014, Bakhshandeh ym. 2012, Ishiguro ym. 2017). On huomattu, että päällystämätön DNA on usein tehoton transfektioon, koska se voi hajota ennen aikaisesti eikä näin ollen anna haluttua vastetta. (Sokolova ym. 2006).

Synteettiset menetelmät on suunniteltava niin, että ne eivät aiheuta soluille toksisuutta, infektiota tai immunogeenisiä reaktiota, ovat sovellettavissa erilaisille soluilla ja isolle joukolle ja lisäksi niillä on oltava kyky kuljettaa myös suuria terapeuttisia geenejä soluihin. (Abdul Halim ym. 2014) Transfektion tehokkuus riippuu menetelmän lisäksi monista asioista, kuten esimerkiksi solutyypistä, nukleiinihapon ominaisuuksista ja puhtaudesta sekä mediumista jossa solut kasvavat (Bakhshandeh ym. 2012). Rao ym. (2015) mukaan transfektio-menetelmältä vaaditaan, että se pystyy kuljettamaan riittävän suuren määrän siirrettävää nukleotidisekvenssiä, ja että menetelmä on yhteensopiva erityyppisten solujen ja medium/seerumi tyyppien kanssa. Menetelmältä vaaditaan myös, että se toimii hyvin tietyille biomolekyyliille pientenkin määrien siirrosta, edesauttaa sen koossa pysymistä tai mahdollisten sivutuotteiden hajoamista. Lopuksi on myös tärkeää, että siirretty nukleotidi pääsee

kulkeutumaan tumaan ja kiinnittymään oikeaan kohtaan solun genomissa. Transfektion onnistumiseen on yhdistetty solujen jakaantuminen, mutta on myös osoitettu, että transfektio voi myös tapahtua ilman mittoosia (Chernousova & Epple 2017). Lipideihin perustuvaa Lipofectamine (Invitrogen, Life Technologies, USA) menetelmää on pidetty tehokkaana ja soveltuvana hyvin monille solutyypeille. Toisaalta sen haittapuolina ovat kalliit reagenssikulut ja sopivuus vain pienelle solumäärälle. Elektroporaatiota pidetään erittäin tehokkaana menetelmänä, joka vaatii toimiakseen todella suuren solumäärän. Kalsiumfosfaattisaostus ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) menetelmä puolestaan on reagenssien osalta hyvin edullinen nukleiinihappojen, kuten esimerkiksi cDNA:n tai RNA:n transfektioon, mutta tehokkuus vaihtelee paljon olosuhteiden ja solutyypin mukaan. (Guo ym. 2017)

Mesenkymaalisten kantasolujen käyttö työkaluina erilaisissa terapeuttisissa sovelluksissa vaikuttaa lupaavalta. Kantasoluihin perustuvien terapeuttisten hoitojen toivotaan auttavan geneettisten sairauksien hoitoon. Kantasolut toimivat normaaleissa kudosaaurioissa ja onkin odotettavissa, että kantasolut yhdessä geeniterapian kanssa tuottaisivat hyviä tuloksia sairauksien hoidoissa. Mesenkymaalisten kantasolujen manipulointi on haastavaa, sillä kantasolut pystyvät jossakin määrin vastustamaan vieraan DNA:n tai RNA:n transfektiota. Tehokkaan ja turvallisen transfektio-menetelmän löytäminen edesauttaa kantasolujen manipulointia ja sitä kautta lisää niiden käytettävyyttä.

2.6.1 FuGENE transfektio menetelmä

FuGENE HD (Promega, USA) on kaupallisesti saatava kemiallinen solujen transfektioon soveltuva reagenssi. Reagenssi on ei-liposomaalinen, se ei ole pienillä pitoisuuksilla soluille haitallinen eikä se sisällä eläinperäisiä tai ihmisperäisiä yhdisteitä. FuGENE on helppokäyttöinen ja toimii myös vaikeasti transfektoitavilla solulinjoilla, kuten kantasoluilla. FuGENE reagenssin valmistaja (Promega) ei kerro yhdisteen tarkkaa koostumusta. Valmistaja kuitenkin kertoo, että reagenssi koostuu n. 80% etanolista ja se sekoitetaan aina suoraan seerumittomaan mediumiin ja varotaan samalla, ettei reagenssi kosketa muoviputkea. FuGENEn kosketus muovin kanssa alentaa transfektio- tehokkuutta huomattavasti, koska muovi voi inaktivoida reagenssin. FuGENEn kanssa on suositeltua käyttää vahvempaa DNA pitoisuutta paremman transfektio- tehokkuuden parantamiseksi (Jacobsen ym. 2009, Promega). Valmistaja kehottaa optimoimaan tapauskohtaisesti ainakin FuGENE HD transfektion reagenssi/ DNA suhteen, tarvittavan DNA määrän, käytettävät solutyypit ja niille sopivat mediumit (Promega).

2.6.2 Lipofectamine transfektiomenetelmä

Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Life Technologies, USA) on kaupallisesti saatavilla oleva kemiallinen transfektioreagenssi, joka sopii hyvin sekä DNA että RNA transfektioon. Lipofectamine reagenssin tehokkuutta voidaan optimoida muuttamalla lipidien kokoonpanoa. (<http://patents.com/us-7479573.html>, luettu 3.1.17) Kemiallisissa transfektio-menetelmissä kationiset lipidit ympäröivät ja neutralisoivat negatiivisesti varautuneen DNA:n, jotta se pystyy kulkeutumaan soluun. Transfektion onnistumiseen vaikuttaa lipidien koostumus sekä lipidi/DNA-kompleksin kokonaisvaraus. Käytettävät lipidit ovat amfiifiilisiä koostuen positiivisesti varautuneesta päästä ja hydrofiilisestä hännästä. Lipidi/DNA kompleksin muodostuminen on dynaaminen prosessi, koska molekyylit eivät sitoudu toisiinsa vahvojen kovalenttisten sidosten avulla, vaan molekyylit sitoutuvat epästabiilien heikkojen vuorovaikutusten avulla. Kompleksia koossapitäviä vuorovaikutuksia ovat sähköinen vuorovaikutus DNA:n ja lipidien polaarisen pään kanssa, hydrofobiset vuorovaikutukset lipidiketjujen välillä ja lisäksi DNA voi aiheuttaa itsensä kanssa sähköistä repulsiota. Kompleksien tarkkaa rakennetta ja mekanismia ei voida täysin tietää, sillä kaupalliset valmistajat eivät kerro lipidireagenssien koostumusta (Ishiguro ym. 2017, Jacobsen ym. 2004).

Lipofectaminella luvataan olevan hyvä tehokkuus, jopa sellaisille soluille joihin yleensä on vaikea transfektoida vierasta DNA:ta. Tämä menetelmä sopii hyvin sekä DNA:n ja siRNA/miRNA:n transfektioon. Koska menetelmä perustuu endosytoosiin eli soluille ominaiseen biologiseen mekanismiin, tarvitsee ainoastaan luoda hyvät olosuhteet reaktion tapahtumiselle. Tämä menetelmä on hyvä vaihtoehto ei-virusperäisille transfektioille. Plasmidin lysosomaalinen hajoaminen tai solun sisäinen aineiden liikkuminen tai metabolia voivat heikentää menetelmän transfektiotehokkuutta. (Cardarelli ym. 2016). Yksi tämän menetelmän haittapuoli on, että siirrettävän DNA:n pitää olla kapseloituneena liposomin sisään jolloin sen kokonaisvaraus voi olla negatiivinen. Tämä vaikeuttaa kiinnittymistä solukalvoon joka itsessään voi olla varaukseltaan hiukan negatiivinen. Toisaalta lipidikoostumusta muuttamalla kompleksista saadaan muokattua kokonaisvaraukseltaan positiivinen, jolloin kuljetus soluun pitäisi onnistua. Haasteena on, että eri soluilla voi olla erilainen lipidikoostumus solukalvolla, joten myös reagenssin liposomien koostumusta pitää muuttaa tapauskohtaisesti. Sama vektori ei toimi kaikilla solutyypeillä samalla tavalla. (<http://patents.com/us-7479573.html>, luettu 3.1.17)

2.6.3 Kalsiumfosfaattisaostus menetelmä

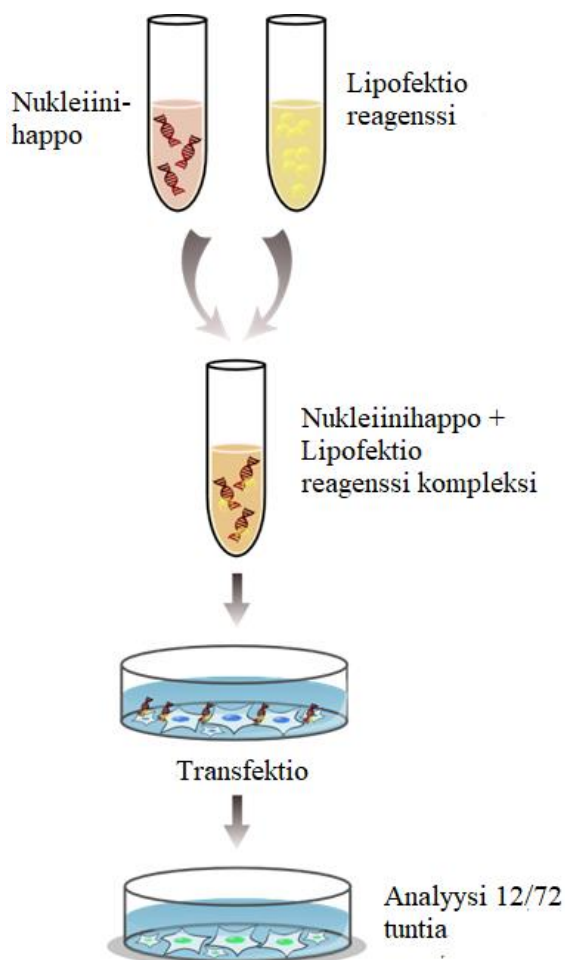
Kalsiumfosfaattisaostus ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) on jo pitkään käytetty kemiallinen transfektiomenetelmä, jossa muodostetaan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostuma siirrettävän DNA:n ympärille ja muodostunut kompleksi kuljetetaan endosytoosin tai fagosytoosin avulla solukalvon läpi tumaan. Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmä perustuu spontaaniin saostukseen ylikylläisessä liuoksessa. Kalsiumfosfaatin saostuma on nopea ja palautuva kemiallinen reaktio ja siksi menetelmä on haasteellista saada toimimaan aina samalla tavalla. Kalsiumfosfaattisaostuman muodostuminen DNA:n ympärille vaatii kemiallisesti oikeanlaiset olosuhteet, sillä yhdisteen liukoisuuteen voi vaikuttaa monet tekijät, kuten esimerkiksi lämpötila, pH ja reagenssien konsentraatio. Myös partikkeleiden rakeiden koko ja sekoittaminen liuoksia yhdistäessä ovat tärkeitä tekijöitä saostuman muodostumiselle. Mukana oleva DNA liittyy spontaanisti saostumaan ja muuttaa partikkeleiden ominaisuuksia (Jordan ym. 1996, Jordan & Wurm 2004). Saostuman positiiviset Ca^{2+} ionit neutralisoivat ja stabiloivat negatiivisen DNA:n varauksen. Kompleksi kulkeutuu solun sisälle ilman entsymaattista kalvon hajoamista (Chernousova & Eppler 2017, Xu ym. 2016).

Kalsiumfosfaattisaostusta voidaan käyttää kahdella eri tavoin. DNA voi olla ympäröity kalsiumioneilla, jolloin kyseessä on kaksikerroksinen nanopartikkeli. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ voi toimia myös ensin ytimenä, jonka ympärille DNA kiinnittyy ja sitten päälle lisätään vielä kerros kalsiumioneita. Tällaisena stabiilina kolmikerroksisena rakenteena plasmidia voidaan suojata paremmin solunsisäiseltä hajoamiselta ja tehokkuus transfektiossa kasvaa. Toisaalta liian suuren kompleksin kuljettaminen solun sisään voi olla hankalaa. (Sokolova ym. 2006).

Hepes Buffered Saline (HBS) (BioUltra, Sigma-Aldrich) on puskuroitu suolaliuos, jossa kalsiumionit ja fosfaatti-ionit muodostavat saostuman plasmidin ympärille. Puskuriliuos myös pitää liuoksen pH:n vakiona. Liuoksen pH on tässä menetelmässä kriittinen tekijä kalsium-DNA-kompleksin muodostumiselle ja optimaalisena pH alueena pidetään 7.05-7.10. Siirrettävän plasmidin koko on rajoittava tekijä ja tällä menetelmällä suositellaan käytettäväksi DNA:ta jonka koko olisi 5.3 – 6 kb välillä. Liian suuri DNA:n konsentraatio haittaa työn onnistumista. (Batard ym. 2001, Guo ym. 2017, Jordan ym. 1996) DNA voi myös mahdollisesti vaikuttaa kalsiumfosfaattisaostuman liukoisuuteen ja siksi DNA:n määrä testauksessa on kriittinen tekijä onnistumisen kannalta. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostusmenetelmä voisi toimia paremmin alhaisemmissa lämpötiloissa, vaikkakin yleisesti suositellaan reagenssien olevan huoneenlämpöisiä. (Jordan ym. 1996) Kalsiumfosfaatin komponenteilla on vahvat varaukset (Ca^{2+}) ja (PO_4^{3-}) ja siksi ne pystyvät sitoutumaan hyvin muihin orgaanisiin

varauksellisiin molekyyleihin. Nämä vahvasti varautuneet ionit ovat myös korvattavissa muilla yhtä vahvoilla ioneilla kuten esimerkiksi karbonaattiryhmällä (CO_3^{2-}) tai Mg^{2+} ionilla. (Khan ym. 2016).

Mediumin pH vaikuttaa saostuman pysyvyyteen. Kalsiumfosfaattisaostus ei ole yhtä stabiili rakenne kuten monet muut käytettävät transfektioreagenssit ja tämä biomolekyylin epävakaus tuo haasteita menetelmän optimointiin. DNA:n puhtaus ja koko ovat tärkeässä osassa työn onnistumisen kannalta. (Jordan & Wurm 2004). Kalsiumfosfaatti muodostaa DNA:n ympärille hyvin samantapaisen kapselin kuin virusperäisessä menetelmässä, kun kompleksin pinnalle muodostuu laaja varaustiheys. Kalsiumfosfaattisaostus jäljittelee virusten kykyä muodostaa kapseli, mutta ei tuo mukaan virusten käytön haasteita. (Khan ym. 2016). Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmä on edullinen ja helppo toteuttaa, mutta liian suurina pitoisuuksina reagenssit voivat olla soluille toksisia. Oikeanlaisena pitoisuutena saostuma hajoaa helposti verrattuna moniin muihin käytettäviin nanopartikkeleihin, kuten esimerkiksi rauta- tai piioksidiin (Chernousova & Epple 2017, Sokolova ym. 2006, Xu ym. 2016). Kuvassa 4. on havainnollistettu $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus menetelmän periaate kaaviokuvana.



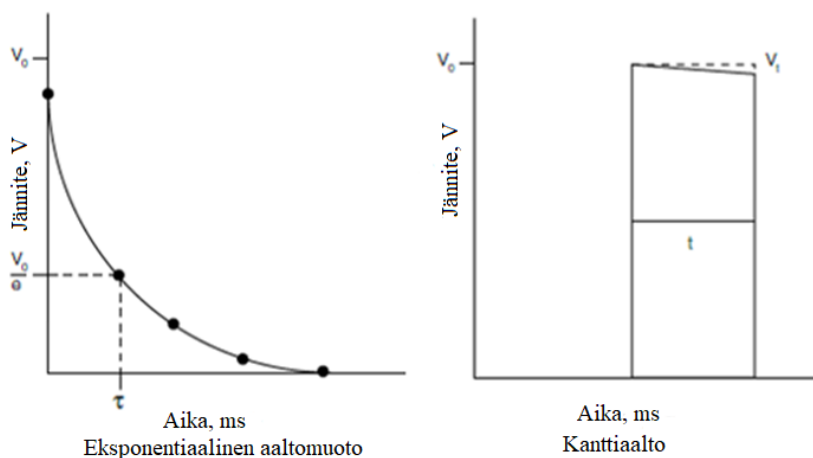
Kuva 4. Kalsiumfosfaattisaostus menetelmän transfektio kaaviokuvana. Kuva muokattu lähteestä: www.ozbiosciences.com

2.6.4 Elektroporaatio

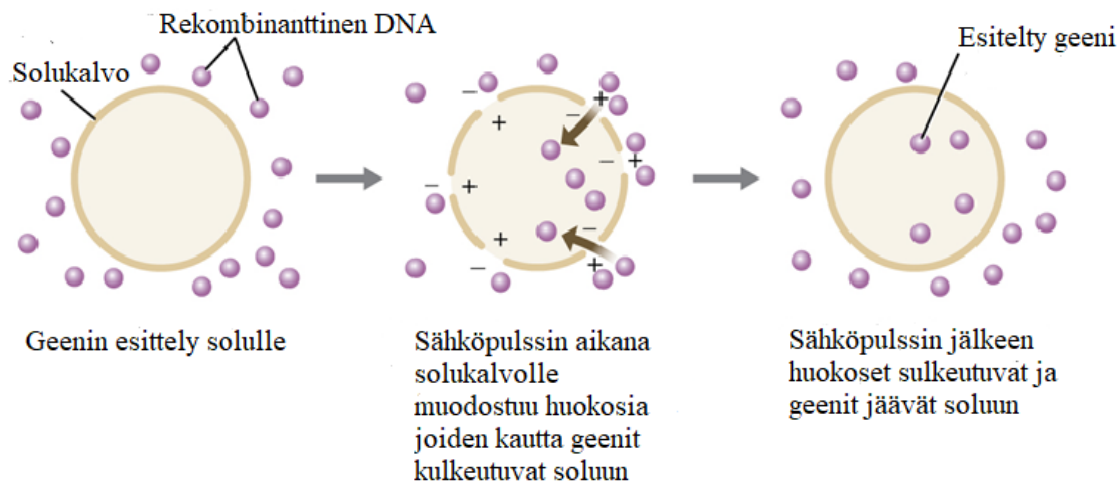
Elektroporaatio on yleinen fysikaalinen transfektio-menetelmä, jossa käytetään korkeajännitteistä sähkökenttää DNA:n tai RNA:n siirtoon. Lyhyet ja voimakkaat sähköpulssit aikaansaavat solukalvon rakenteen heikkenemisen ja kalvoon muodostuu aukkoja, joiden kautta vieras DNA pääsee kulkeutumaan soluun. Aukot sulkeutuvat solukalvossa itsestään, kun sähkövirta on katkaistu. Menetelmä soveltuu hyvin useille solutyypeille, koska sen onnistumiseen ei vaikuta solukalvon rakenne toisin kuin kemiallisissa menetelmissä. Elektroporaation myös sanotaan käyvän sekä lyhytaikaiseen että pysyvään transgeenin tuottamiseen.

Normaalisti solukalvo ei päästä sähkövirtaa läpi ionikanavia lukuun ottamatta. Tätä solukalvon ominaisuutta hyödynnetään elektroporaatiossa. Nopeat sähköpulssit (300–400 mV, 100 μ s) saavat solukalvoon riittävän suuria aukkoja, jotta suurikokoiset DNA-molekyylit pääsevät kalvon läpi. Pulssien määrää ja voimakkuutta säädellään tarkasti, sillä liian suuret aukot solukalvossa tappavat solut. Elektroporaatiossa DNA:ta ei suojaa mikään ulkopuolinen kemikaali ja siksi sen rakenne voi tuhoutua ennen tumaan pääsyä. Toisaalta päällystämätön DNA on nopeammin hyödynnettävissä ja mahdollista liittää isäntäsolun genomiin. (Ding ym. 2017, Kurita ym. 2016, Potter & Heller 2003)

Elektroporaatiossa voidaan käyttää kahdenlaista sähköpulssin muotoa, exponential-decay ja square-wave muotoista pulssia. Yleisempi aaltomalli on suorakulmion mallinen sähköpulssi, mutta molempia menetelmiä käytetään eri solutyypeistä riippuen. (Chicaybam ym. 2017). Kuvassa 5. on havainnollistettu käytettävien sähköpulssien muotoa.



Kuva 5. Elektroporaation sähköpulssien muoto havainnollistettu kaaviona. Kuva muokattu lähteestä: www.bio-rad.com



Kuva 6. Kaaviokuva elektroporaation toiminnasta. Kuva muokattu lähteestä:

<https://bio.libretexts.org>

Kuvasta 6. nähdään yksinkertaistettu kaaviokuva elektroporaation toiminnasta. Lähtötilanteessa solut ja siirrettävä DNA ovat samassa liuoksessa, korkeajännitteisen sähkökentän aikana solukalvoon muodostuu aukkoja, joiden kautta molekyylit siirtyvät solun sisäpuolelle. Lopuksi solukalvo palautuu ennalleen ja DNA voi kulkeutua solun tumaan.

Elektroporaation käyttäminen on suhteellisen kallista, laitekustannusten lisäksi ylläpito ja testaaminen maksavat paljon, siksi hinta rajoittaa menetelmän laajempaa käyttöä tutkimuksissa. Menetelmän optimoimiseksi tietyille solutyypille täytyy kaikki parametrit testata erikseen kuten pulssien amplitudit, pulssien määrä ja leveys, voltin voimakkuus ja solumäärä. Elektrodien rakenteeseen ja sähköpulssien keston voidaan myös vaikuttaa. Voimakkaamman sähköpulssin käyttö nostaa transfektiotehokkuutta, mutta myös lisää solujen kuolleisuutta, joten on tärkeää löytää oikeanlainen tasapaino riittävälle transfektiolle ja solujen elinkelpoisuudelle. (Abdul Halim ym. 2014, Chicaybam ym. 2017, Kurita ym. 2016). Tämä menetelmä tarvitsee noin viisinkertaisen määrän soluja/DNA:ta verrattuna muihin menetelmiin. Tässäkin menetelmässä DNA näytteiden puhtaus on tärkeää, sillä mukana olevat varaukselliset epäpuhtaudet voivat häiritä onnistumista tuhoamalla nukleotidejä.

Menetelmän käyttöä varten on kehitetty useita kaupallisia laitteita. Laitteet ovat usein jo valmiiksi ohjelmoituja erilaisille solutyypeille ja erilaisille solumäärille. Täysin absoluuttisia nämä valmiit ohjelmat eivät ole, joten menetelmää voi optimoida säätämällä laitetta manuaalisesti tai testaamalla useita eri ohjelmia samoille solutyypeille. Sähköpulssien aikana solukalvon läpi voidaan siirtää DNA:n lisäksi esimerkiksi lääkkeitä. Menetelmää voidaan hyödyntää useissa erilaisissa lääketieteen ja bioteknologian sovelluksissa, kuten esimerkiksi syöpähoidoissa (Hanna ym. 2017).

2.6.5 siRNA-transfektio

siRNA (small interfering RNA) on tyypillisesti noin 20–27 emäsjuosteen pituinen, ja tällä kaksijuosteisella RNA:lla on kyky hiljentää geenin ilmentymistä sekvenssispesifisellä tavalla. mRNA:n (messenger RNA) hiljentäminen käyttäen siRNA menetelmää on kätevä työkalu esimerkiksi solun biologisen toiminnan tarkasteluun lääkeaineiden kuljetuksessa ja selvittää solujen geenien toimintaa. siRNA on yksi eniten käytetyistä geeninhiljennysmenetelmistä, sillä sen käyttö mahdollistaa lähestulkoon minkä tahansa geenin hiljennyksen. siRNA:lla on paljon lääketieteellistä potentiaalia ja sitä tutkitaan paljon jopa II ja III faasissa. (Jensen ym. 2014, Xiao ym. 2015, Xu ym. 2016).

siRNA mahdollistaa nopean ja tehokkaan geenin hiljentämisen useiden kaupallisten reagenssien avulla. Tässä työssä käytetään RNAiMAX Lipofectamine (Invitrogen, Life Technologies, USA) reagenssia. Solutyyppien ja solulinjojen kanssa menetelmän toiminnassa voi esiintyä paljon vaihtelua ja juuri tämä suuri vaihtelevuus aiheuttaa menetelmän käytössä haasteita. Työssä käytettävän RNAiMAX Lipofectamine reagenssin korkea lipidipitoisuus voi olla soluille toksista. On selvää, että jos halutaan maksimoida transfektion tehokkuus ja minimoida haitalliset sivuvaikutukset, optimointi täytyy tehdä erikseen eri solulinjoille. Optimointiin vaikuttavat esimerkiksi solumäärä, lipidien konsentraatio ja geenin hiljennyksen tarvittava aika. Kaupallisen reagenssin sanotaan toimivan hyvin useille solutyypeille siRNA:n kuljettamisessa solun sisälle. (Life Technologies, Xiao ym. 2015) Haasteena kaupallisen reagenssin käytössä on, että sen käyttöä voidaan säädellä vain reagenssien pitoisuuksia muuttamalla.

CIP2A (Cancerous Inhibitor of PP2A) proteiini on onkoproteiini, joka inhiboi PP2A:n toimintaa ja siten lisää solujen maligniteettiä. CIP2A:n on havaittu edesauttavan useiden syöpätyyppien muodostumisessa ja etenemisessä. (Liu ym. 2017, Zhang ym. 2015). Julkaisemattomien tulosten perusteella CIP2A proteiinia esiintyy myös mesenkymaalisissa kantasoluissa. Työssä haluttiin testata mahdollisuutta transfektoida CIP2A kohdennettu siRNA mesenkymaalisiin kantasoluihin. Tässä työssä käytetty scrambled siRNA, SCR, toimii negatiivisena kontrollina, jossa on sama nukleotidi koostumus, mutta sekvenssi on erilainen. Negatiivinen kontrolli voidaan saada aikaan satunnaisella sekvensoinnilla tai tekemällä siRNA sekvenssistä käänteisen normaaliin sekvenssiin nähden. Scrambled siRNA ei saa muistuttaa mitään tunnettua geeniä, eikä saa vaikuttaa solun elinkykyyn tai fenotyyppiin. (www.dharmacon.gelifesciences.com, luettu 22.9.2017)

2.6.6 Western blot

Western blot on semi-kvantitatiivinen metodi, joka erottelee molekyylejä niiden painon, koon tai varauksen suhteen. Menetelmän avulla voidaan tunnistaa proteiineja, mutta sen avulla ei saada tarkkaa tietoa proteiinin määrästä. Western blot on yleinen ja paljon käytetty molekulaarinen testausmenetelmä ja se soveltuu erityisesti proteiinien erotteluun. Western blot analyysissä denaturoituneita proteiineja voidaan erottaa niiden peptidiketjun koon perusteella. Proteiinit erotellaan esimerkiksi SDS-polyakryyliamidigeelillä sähkövirran avulla, minkä jälkeen näytteet siirretään PVDF-kalvolle (Polyvinylidene fluoride) jälleen sähkövirran avulla. PVDF-kalvolta proteiinit voidaan havainnoida immunovärjäyksen avulla. (Ghosh ym. 2014, Mahmood & Yang 2012)

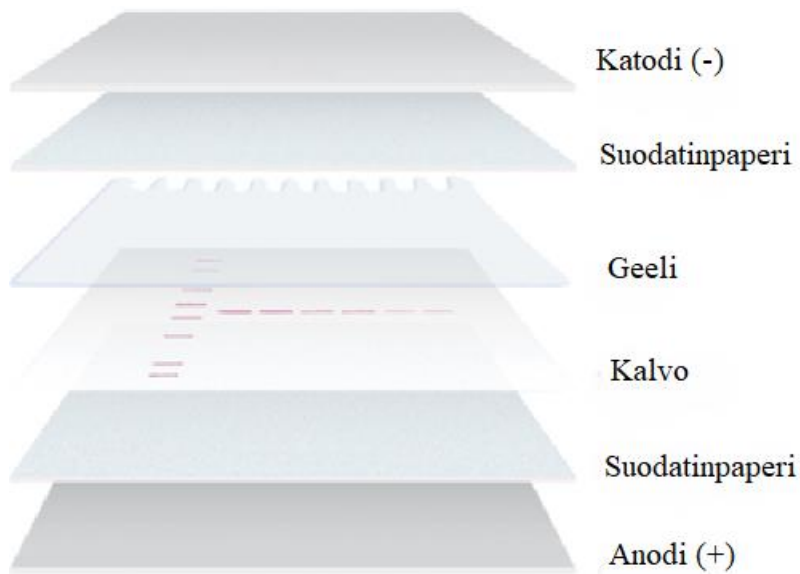
Tutkittavat proteiinit täytyy ensin erottaa solunäytteistä ja sen jälkeen denaturoida ne. Western blottausta varten solunäytteet hajotetaan esimerkiksi kuumentamalla, mekaanisella hajottamisella ja merkaptotoetanolilla jolloin solujen sisältämät proteiinit vapautuvat soluliukseen. Kuumentaminen myös hajottaa soluissa esiintyviä proteaaseja, ja näin ollen ne eivät pääse hajottamaan työn aikana tarkasteltavia näytteitä. Lyysaukseen on tässä työssä käytetty mekaanisen hajotuksen lisäksi SDS β -merkaptotoetanolia, joka denaturoi proteiinit suoriksi peptidiketjuiksi. SDS-molekyylit (Natriumlauryylisulfaatti) sitoutuvat peptidiketjuun antaen denaturoituneelle proteiinille negatiivisen varauksen.

Western blotissa käytetään kahta erilaista SDS-polyakryyliamidigeeliä, jotta tuloksesta saadaan luotettavampi. Ylägeeli (pH 6.8) on huokoinen, mutta ei vielä erottele proteiineja kunnolla. Alageelissä (pH 8.8) huokoisuus on pienempää ja proteiinit erottuvat selkeämmin kokonsa mukaan, koska pienemmät proteiinit kulkeutuvat nopeammin kuin isokokokoiset molekyylit. Ajoaikaa sekä sähkövirran voimakkuutta voidaan säädellä ajon aikana, sillä esimerkiksi liian voimakas virta voi vääristää näytteitä. SDS-PAGE:a (SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi) käytetään usein denaturoitujen proteiinien erotteluun, sillä negatiivisesti varautuneet proteiinit kulkeutuvat sähkövirran aikana kohti positiivista napaa kokonsa mukaisesti. Ennen proteiinien erottelua geelillä, näytteet laimennetaan latauspuskuriin, jolloin näytteet saadaan paremmin laskeutumaan ajogeelin kaivojen pohjaan. Myöhemmin puskuriliuos myös auttaa proteiineja kiinnittymään membraaniin paremmin. Latauspuskurissa käytetään myös bromophenol blue väriainetta joka auttaa havaitsemaan näytteiden etenemisen geelissä ajon aikana. Ajoa varten geelille lisätään myös positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte. Positiivisen kontrollinäytteen kohdalla käytetään tunnettua lähdettä kohdeproteiinista, kuten esimerkiksi hyvin puhdistettua proteiinia. Positiivinen kontrollinäyte auttaa

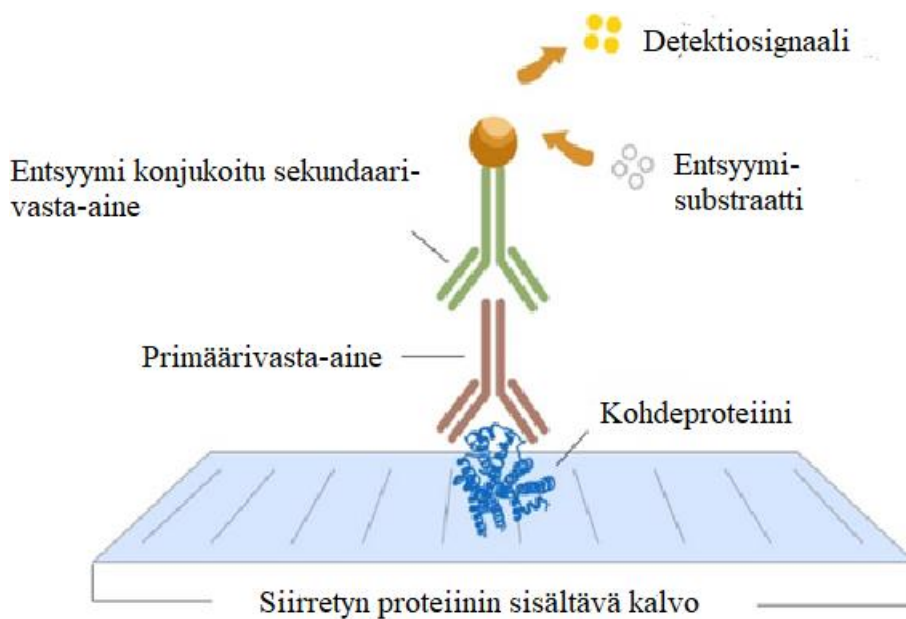
tunnistamaan kohdeproteiinin ja varmistaa vasta-aineen aktiivisuuden. Negatiivisena kontrollinäytteenä puolestaan varmistaa, ettei värjäys ole epäspesifinen. Mukana olevaa beta-aktiinia käytetään proteiinitasojen tarkkailuun ja normalisointiin (Ghosh ym. 2014, Mahmood & Yang 2012).

Eroteltu proteiiniseos siirretään ajogeeliltä PVDF-kalvolle käyttäen avuksi sähkökenttää, joka on kohtisuoraan geelin pintaan nähden. Käytettävän kalvon on oltava tarpeeksi tukeva ja helposti pestävissä häiriötekijöiden välttämiseksi. Siirto tehdään muodostamalla kerrostettu paketti (havainnollistettu kuvassa 7.), joka sisältää geelin, PVDF-kalvon ja suodatinpaperia ja huokoista selluloosaa. Proteiineja siirrettäessä geeliltä kalvolle pitää varmistua, että osat ovat tarpeeksi tiiviissä kontaktissa toisiinsa eikä ilmakehiä pääse muodostumaan. PVDF-kalvossa oleville proteiineille tehdään blokkaukset käyttäen rasvatonta 5 % maitoliuosta tai 5 % BSA:ta (Bovine Serum Albumin). Blokkauksen ansiosta voidaan välttää vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista kalvolle. Blokkauksen jälkeen kalvo pestään ja lisätään mukaan primäärivasta-aine, joka voidaan laimentaa sopivaksi suoraan pesuliuokseen. Lopuksi ylimääräinen sitoutumaton vasta-aine pestään pois. Pesun ansiosta saadaan kalvolta poistettua häiritsevää taustaa, kuitenkin liian pitkä pesu voi heikentää tutkittavan proteiinin signaalia. (Ghosh ym. 2014, Mahmood & Yang 2012)

Primäärivasta-aine sitoutuu tutkittavaan kohdeproteiiniin, mutta se ei itsessään vielä riitä aiheuttamaan havaittavaa signaalia, joten sen lisäksi käytetään sekundäärivasta-ainetta, joka sitoutuu primäärivasta-aineeseen. Sekundäärivasta-aineeseen on konjugoituna entsyymiä, jossa on mukana HRP-Tag (horseradish peroxidase). Juuri ennen kalvon detektointia kalvo pidetään liuoksessa, jossa on mukana entsyymin kanssa sitoutuvaa ECL-substraattia (WesternBright ECL, enhanced luminolbased chemiluminescent substrate, eli piparijuuriperoksidaasisubstraatti). Substraatin sitoutuminen entsyymiin aiheuttaa kemiluminesenssi-ilmiön, josta muodostunut valosignaali voidaan havaita erityisellä ChemiDoc (BioRad) detektiolaitteella. Detektiolaitte on ohjelmoitu muodostamaan tietokoneelle kuva tutkittavan proteiinin kohdalla tapahtuvasta kemiluminesenssiireaktiosta. Ideaalitapauksessa valmiissa membraanissa nähdään vain yksi proteiinijuova. Kuvassa 8. on havainnollistettu vasta-aineiden sitoutuminen tutkittavaan proteiiniin ja muodostuvan kemiluminesenssi-ilmiön toimintaperiaate. (Ghosh ym. 2014)



Kuva 7. Kaaviokuva proteiinien siirrosta SDS-polyakryyliamidigeeliltä PDVF-kalvolle. Kuva muokattu lähteestä: www.bio-rad.com



Kuva 8. Havainnollistettu proteiinien todentaminen Western blot analyysissä. Kuva muokattu lähteestä: www.elabscience.com

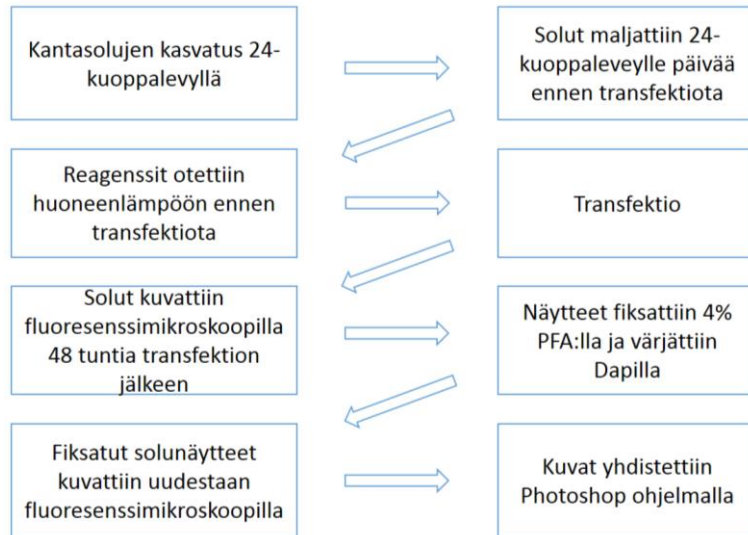
3. Tutkimuksen tavoitteet

Tämän työn tarkoituksena on löytää tehokas transfektio-menetelmä rasvan ja luuytimen kantasoluille. Työn aikana on tarkoitus testata ja optimoida neljä erilaista menetelmää kuljettaa Actin Chromobody-GFP ja pmax-GFP plasmideja tutkittaviin kantasoluihin. Actin Chromobody plasmidin tuottama proteiini pystyy sitoutumaan kantasolujen aktiinitukirankaan. pmaxGFP:n tuottaman proteiini puolestaan levittäytyy ja sitoutuu epäspesifisesti solulimaan. Transfektion onnistumista tarkastellaan fluoresenssimikroskoopilla, kun kantasolujen solutukiranka tai solulima on värjäytynyt fluoresoivalla proteiinilla vihreäksi. Menetelmä mahdollistaa elävien solujen ja niiden toiminnan tarkastelun. siRNA transfektion avulla voidaan estää kohdeproteiinin toiminta solussa vaikuttamalla kohdennetusti proteiinin lähetti-RNA tasoon. SiRNA transfektion onnistumista voitiin tarkkailla kohdeproteiinin tasojen avulla käyttäen Western Blot-tekniikkaa.

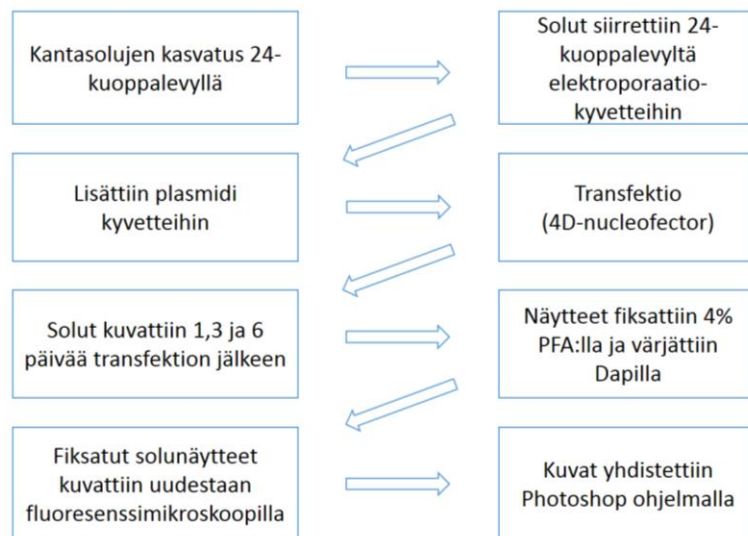
4. Materiaalit ja menetelmät

Työn kulku on kuvattuna lyhyesti taulukoissa 2. ja 3.

Taulukko 2. Kemiallisten transfektio-menetelmien työn kulku



Taulukko 3. Fysikaalisen transfektio-menetelmän työn kulku



4.1 Rasvan ja luuytimen kantasolujen kasvatus

Käytetyt rasvan ja luuytimen kantasolujen solunäytteet on saatu aikuisilta luovuttajilta kirurgisen toimenpiteen aikana Tampereen yliopistollisesta sairaalasta. Solunäytteet ovat eristetty rutiinimaisilla ja paljon käytetyillä kemiallisilla ja mekaanisilla menetelmillä. Kaikki tämän työn kokeet on suoritettu solujen jakaantumisluvun ollessa 2-7. Rasvan kantasoluja on kasvatettu niille ominaisessa

mediumissa: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco™, Invitrogen, Life Technologies), ihmisen seerumi 5 % (HS, BioWest), 1 % glutamiinia (GlutaMAX™, Invitrogen, Life Technologies) ja 1 % antibioottia 100 U/ml penisiliini ja 0.1 mg/ml streptomycin (P/S; Invitrogen, Life Technologies). Luuytimen kantasoluja on puolestaan kasvatettu seuraavan laisessa mediumissa: α MEM (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), Ihmisen seerumi 5 % HS(BW), 1 % antibioottia (100 U/ml penisiliini ja 0.1 mg/ml streptomycin, Lonza, BioWhittaker™) ja 5 ng/ml ihmisen fibroblasti kasvutekijä-2 (hFGF-2, Miltenyi Biotec).

Soluja on kasvatettu solukasvatuspulloissa ($A^2 = 75 \text{ cm}^2$) niille tyypillisessä mediumissa. Ennen maljausta solut on pesty Dul-becco's Phosphate Buffered Salinella (DPBS) (Lonza BioWhittaker, Thermo Fisher Scientific) ja irrotettu trypsiinin (TrypLE Select™ CTST™, Gibco, Invitrogen) avulla kasvatuspullon pohjasta. Trypsiinin vaikuttaessa näytteet on pidetty inkubaattorissa ($T = 37^\circ \text{C}$, $[\text{CO}_2]$ 5 %, 95 % suhteellinen kosteus) 5-13 min. riippuen solutyypistä ja solujen siirrostusluvusta. Rasvan kantasoluilla vaikutusaika on ollut n. 10-13 min. Luuytimen kantasoluilla Trypsiinin vaikutusaika on ollut 5-10 min. Solujen siirrostusluvun kasvaessa, myös Trypsiinin vaikutusaika kasvoi. Irrotetut solut suspensoitiin mediumiin ja pidettiin sentrifuugissa (5 min. RT, 1000 rpm). Solupelletin päältä poistettiin supernatantti ja pelletti suspensoitiin mediumiin. Solumäärät laskettiin Bürkerin kammiossa ja laskujen perusteella tehtiin tarvittavat solulaimennokset riippuen tarvittavasta solumäärästä kuoppaa kohden. Soluliuokset pipetoitiin 24-kuoppalevyille 500 ml/kuoppa. Solut laitettiin inkubaattoriin seuraavana päivänä tehtävään transfektioon asti. Ylimääräiset soluliuokset laitettiin uudelle kasvatuspullolle kasvamaan seuraavia testejä varten. Solukasvatuksessa medium vaihdettiin puolittain kolmen päivän välein, ellei soluille tehty transfektiota. Soluja myös tarvittaessa jaettiin uusille solukasvatuspulloille, jos solut olivat päässeet kasvamaan liian tiheään. Luuytimen kantasoluilla on koko testauksen ajan pidetty hFGF-2 kasvutekijää 5 ng/ml liuoksen loppupitoisuudessa. (Case & Rubin 2010, Gimble & Guilak 2003, Lindroos 2009, Lindroos ym. 2009, Zuk ym. 2001). Käytetyt rasvankantasolulinjat tässä työssä ovat hASC (human fat stem cells) 7/12 ja hASC 4/15. Työssä käytetyt luuytimen kantasolulinjat ovat hBMSC 6/16 ja 7/16.

4.2 Solujen fiksaaminen ja värjääminen

Solunäytteet fiksattiin mikroskooppikuvauksen jälkeen kahden vuorokauden kuluttua transfektioista. Soluilta poistettiin kasvatusmedium ja ne pestiin kaksi kertaa DPBS:llä (BioWhittaker, Lonza). Solujen fiksaaminen tehtiin pitämällä soluja 4 % paraformaldehydissä (PFA) 15 minuutin ajan. Seuraavaksi näytteet pestiin kolme kertaa DPBS:llä ennen solujen värjäämistä DAPI:lla (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (Life Technologies, Sigma-Aldrich, 1mg/ml in H_2O).

Soluja värjättiin DPBS:ään laimennetulla DAPI:lla (1:2000) 5 minuutin ajan. Värjäyksen jälkeen näytteet pestiin uudestaan kolmesti DPBS:llä ja lopuksi näytteitä säilytettiin DPBS:ssä +4°C valolta suojattuna.

4.3 Solujen transfektio FuGENE-menetelmällä

Transfektoitaessa soluja FuGENE HD (Promega) reagenssia käyttäen solutiheys olisi hyvä olla noin 60-80%. Kaksi rasvan kantasolulinjaa (P4) maljattiin päivää ennen transfektiota 24-kuoppalevyille käyttäen solutiheyksiä 15,000 ja 30,000 solua/kuoppa. Vastaavasti kaksi hBMSC solulinjaa (P6) maljattiin solutiheyksillä 10,000 ja 20,000 solua/kuoppa. FuGENE reagenssi (Promega) ja Opti-MEM medium (Gibco, Life Technologies) käytettiin huoneenlämpöisenä. Ennen käyttöä FuGENE ja plasmidi DNA käytettiin mikrosentrifuugissa noin parin minuutin ajan, jotta seos olisi tasaista. Eppendorf-putkeen valmistettiin seos, johon lisättiin ensin Opti-MEM mediumia, DNA plasmidia (Actin Chromobody®-TagGFP plasmid, chromotek, Germany) ja lopuksi FuGENE HD reagenssia. Liuoksen annettiin vaikuttaa 11 minuuttia huoneenlämmössä ennen kuin sekoitus lisättiin solujen päälle. Käytetty DNA/ FuGENE suhde oli 3:1. Soluja pidettiin inkubaattorissa 48 tuntia ennen kuvaamista fluoresenssimikroskoopilla (Olympus IX51, Fluorescence Microscope). Kuvauksen jälkeen solut fiksattiin 4 % Paraformaldehydillä, värjättiin DAPI:lla ja lopuksi säilytettiin +4°C valolta suojattuna. Fiksauksen jälkeen solut kuvattiin uudestaan fluoresenssimikroskoopilla ja otetut kuvat yhdistettiin käyttäen Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmaa. hASC soluilla käytetty DNA oli Actin Chromobody, ja luuytimen kantasoluilla testattiin lisäksi myös pmaxGFP plasmidia (pmax GFP, Lonza, 1,0 µg/µl).

4.4 Solujen transfektio Lipofectamine-menetelmällä

Käytettyjä kantasoluja (hASC ja hBMSC) kasvatettiin niille tyypillisessä mediumissa ja maljattiin 24-kuoppalevyille päivää ennen transfektiota. Käytetyt rasvasolulinjat olivat hASC 7/12 ja hASC 4/15 (P5). Molempia solulinjoja maljattiin 3x 15,000 ja 3x 30,000 solua/kuoppa. Käytetyt luuytimen kantasolulinjat ovat hBMSC 6/16 ja hBMSC 7/16 (P3). Luuytimen kantasolut maljattiin rinnakkaisina näytteinä 3x 5,000 ja 3x 10,000 solua/kuoppa. Transfektiopäivänä soluja oli levittynyt kuoppalevyn pohjalle noin 60-80 %:n pinta-alalle. Lipofectamine3000 reagenssi (Invitrogen, Life Technologies, USA) sekoitettiin Opti-MEM mediumiin (Gibco, Life Technologies) eppendorf-putkessa. Plasmidi-DNA, Actin Chromobody (tag GFP2, Mldiprep, 1,25 µg/µl) ja P3000 (Invitrogen, Life Technologies, USA) reagenssi sekoitettiin Opti-MEM:in kanssa erillisissä putkissa. Reagenssit

yhdistettiin ja 10 minuutin inkubaation jälkeen yhdistetty seos lisättiin transfektoitavien solujen päälle. hASC soluille Lipofectamine3000 reagenssilla käytettiin kahta eri Lipofectamine pitoisuutta (1:1,5 and 1:3 DNA/Lipofectamine3000) ja hBMSC soluille käytettiin vain yhtä Lipofectamine pitoisuutta (1:3 DNA/ Lipofectamine3000). Solujen annettiin olla inkubaattorissa 48 tuntia ennen kuin ne kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla. Kuvauksen jälkeen näytteet fiksattiin 4% PFA:lla ja värjättiin DAPI:lla. Seuraavana päivänä värjätty näytteet kuvattiin uudestaan fluoresenssimikroskoopilla DAPI ja GFP filterillä. Kuvat on yhdistetty Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmalla. Rasvan kantasoluilla transfektiossa on käytetty Actin Chromobodyä ja luuytimen kantasoluilla myös lisäksi GFP-plasmidia.

4.5 Solujen transfektio kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus transfektio-menetelmää varten valmistettiin 2 M kalsiumkloridia (CaCl_2) liuottamalla CaCl_2 (s) (Sigma-Aldrich, mw: 110.98 g/mol) puhtaaseen veteen (Milli-Q H_2O). Liuoksen annettiin asettua oikeaan molarisuuteen kaksi päivää, kunnes liuos steriilisuodatettiin valmiiksi transfektiota varten. Solut maljattiin 24-kuoppalevyille päivää ennen transfektiota. hASC (P4) soluja maljattiin molempia linjoja 10,000 ja 20,000 solua/kuoppa. hBMSC (P3) soluja maljattiin 5,000 ja 10,000 solua/kuoppa. Seuraavana päivänä reagenssit otettiin huoneenlämpöön noin tuntia ennen transfektiota. Transfektio suoritettiin pipetoimalla eppendorf-putkeen 2M CaCl_2 , DNA:ta ja steriiliä vettä. Näyteputkea naputtaen lisättiin 2x Hepes Buffered Saline, (BioUltra, Sigma-Aldrich), ja annettiin vaikuttaa RT, 5 minuuttia, ennen liuoksen lisäämistä solujen päälle. Soluja pidettiin inkubaattorissa 48 tuntia ennen kuvaamista fluoresenssimikroskoopilla. Kuvauksen jälkeen solut fiksattiin 4 % PFA:lla 15 minuutin ajan ja näytteet pestiin kolme kertaa DPBS:llä. Solut värjättiin DAPI:lla ja pestiin uudestaan kolmesti DPBS:llä, lopuksi soluja säilytettiin $+4^\circ\text{C}$ valolta suojattuna. Fiksauksen jälkeen solut kuvattiin uudestaan fluoresenssimikroskoopilla ja otetut kuvat on yhdistetty käyttäen Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmaa. hASC soluilla käytetty DNA oli Actin Chromobody, luuytimen kantasoluilla testattiin lisäksi kaupallisesti saatavaa pmaxGFP plasmidia.

4.6 Solujen transfektio elektroporaatio-menetelmällä

Solunäytteet hASC 7/12 ja 4/15 (P6) ja hBMSC 6/16 ja 7/16 (P6) valmistettiin elektroporaatiota varten irrottamalla solut solumaljalta trypsiinin avulla ja laskemalla solumäärät. Tarvittava solumäärä sentrifugoitiin ja solupelletti suspensoitiin 4D Nucleofector solution reagenssiin (Lonza, Switzerland). Molempia hASC-solulinjoja testattiin kahdella eri solumäärällä: 50,000 ja 70,000

solua/kyvetti ja hBMSC näytteillä käytettiin kaikilla samaa solumäärää 125,000 solua/kyvetti. Solususpensio jaettiin eppendorf-putkiin ja näytteisiin lisättiin pmaxGFP:tä tai Actin Chromobodya. Yhdistetty seos laitettiin elektroporaatiokyvetteihin (Nucleocuvette™, Lonza, Switzerland) välttämällä ilmakuplien muodostumista. Näytteet käsiteltiin 4D Nucleofector™ laitteella (Lonza) käyttäen ohjelmaa: FF-104 (High efficiency).

Elektroporaation jälkeen soluja pidettiin 10 min. RT, minkä jälkeen näytteet resuspensoitiin mediumiin (37° C) ja siirrettiin uudelle 24-kuoppalevyille. Tässä menetelmässä näytteistä oli vain yksittäiset kappaleet, ei rinnakkaisia näytteitä kuten muissa menetelmissä. Solujen annettiin olla inkubaattorissa 24 tuntia, kunnes ne kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla. Solut kuvattiin yhden, kolmen ja kuuden päivän kuluttua transfektiosta. Viimeisen kuvauksen jälkeen solut fiksattiin 4% PFA:lla ja värjättiin DAPI:lla. Värjäyksen jälkeen kuvattiin vielä kerran seuraavana päivänä. Kuvat on yhdistetty Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmalla.

4.7 Solujen siRNA-transfektio

Tässä menetelmässä transfektoitiin soluihin kaksijuosteinen scrambled sekä spesifisen proteiinin siRNA (CIP2A: Eurofins MWG, GmbH, Germany) käyttäen apuna Lipofectamine RNAiMAX reagenssia (Invitrogen, Life Technologies, USA). Edellisenä päivänä rasvan kantasolut maljattiin rinnakkaisina näytteinä 24-kuoppalevyille 10,000 solua/kuoppa ja 6-kuoppalevyille 40,000 solua/kuoppa. Vastaavasti hBMSC-soluille tehtiin maljaus 24-kuoppalevyille 5,000 solua jokaista näytettä kohti ja 6-kuoppalevyille 40,000 solua/kuoppa. Käytettävät siRNA:t laimennettiin 1:10 alkuperäisestä pitoisuudesta. Kaikkia reagensseja käytettiin valmistelussa huoneenlämpöisenä. OptiMEM I (Invitrogen) mediumista tehtiin kaksi sekoitusta: laimennettujen siRNA:jen kanssa, sekä RNAimax:ien kanssa. Seuraavaksi liuokset yhdistettiin ja 5 minuutin kuluttua viimeisestä yhdistämisestä liuokset lisättiin solunäytteiden päälle. Soluja säilytettiin inkubaattorissa seuraavaan vaiheeseen asti. 24-kuoppalevyn näytteet fiksattiin 48 tunnin kuluttua 4 % PFA:lla ja värjättiin käyttäen sekä DAPI:a että falloidiinia (Phalloidin-tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate, 05 mg/ml, liuotettu 2 ml metanoliin (MetOH) mw: 1305,57 g/mol). Värjätyt näytteet kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla ja yhdistettiin käyttäen Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmaa. siRNA menetelmän toimivuutta varten 6-kuoppalevyn näytteet fiksattiin 48 tunnin kuluttua transfektiosta ja valmisteltiin näytteet Western blottausta varten.

Taulukossa 4. on käytettyjen siRNA juosteiden sekvenssit:

CIP2A_90.2	5'-CUGUGGUUGUGUUUGCACU-3'
CIP2A_90.3	5'-GGUUGCAGAUUCUGAAUUA-3'
SCR	5'-GUAACAAUGAGAGCACGG-3'

Työssä on haluttu testata siRNA menetelmän toimivuutta ja testattavaksi siRNA:ksi on valittu CIP2A-90.2 sekä CIP2A_90.3 ja lisäksi on otettu mukaan myös negatiivinen kontrolli Scrambled siRNA.

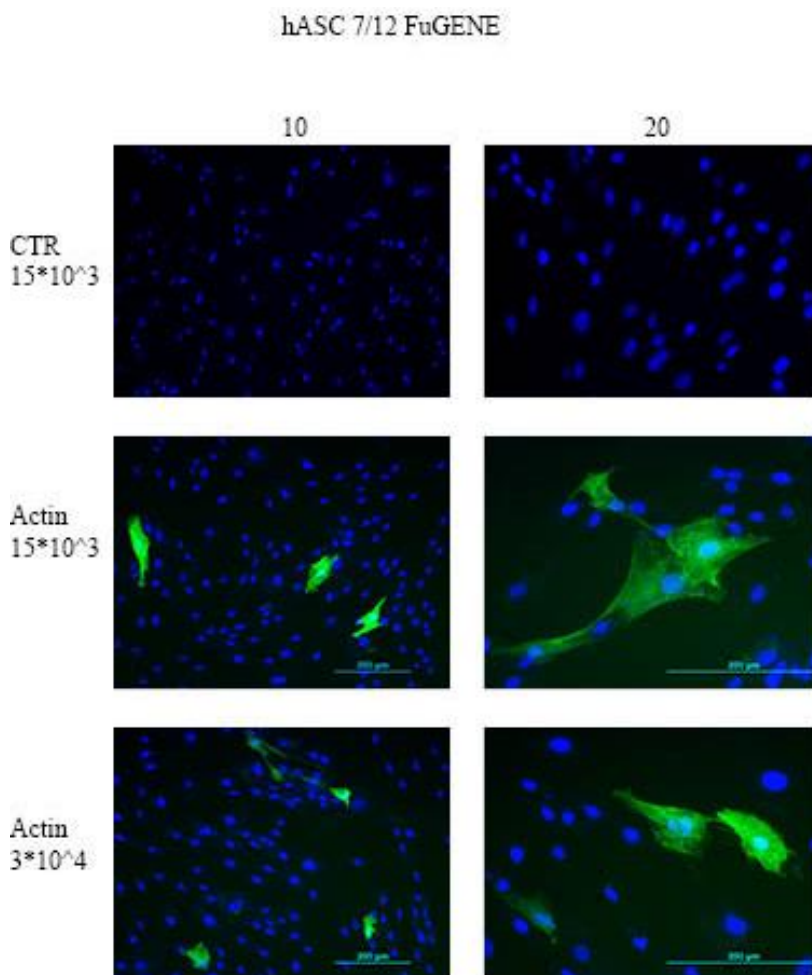
4.8 Western Blot

SiRNA:lla transfektoidut solut lyysattiin käsittelemällä ne 2x Laemmli näytepuskurilla johon oli lisätty 5 % β -merkaptoetanolia (Sigma Aldrich) raaputettiin solut irti maljalta, ruiskutettiin näytteet neljästi hyvin ohuen ruiskun läpi ja pidettiin näytteitä lämpöblokissa (95° C) 5 minuutin ajan. Näytteitä sentrifugoitiin (11 000 rpm) minuutin ajan ja lopuksi varastoitiin pakastimeen -20° C. Western blottausta varten valmistettiin ajogeelit kahdessa osassa, alageelin jähmettymisen jälkeen valmistettiin ylägeeli. Proteiini ja kontrollinäytteet pipetoitiin geelin kaivoihin ja suoritettiin geelin ajo sähkövirran avulla. Ylägeelissä näytteitä ajettiin 90 min. (80 v.) ja alageeliä ajettiin 30 min. (40 v.). Alageeli säilytettiin yön yli siirtopuskurissa. Näytteet siirrettiin PVDF-membraanille (Bio-Rad) geelistä käyttäen avuksi sähkövirtaa (trans-blott-turbo transfer system, program mixed MW 1.3 A, 22 v, 7 min, Bio-Rad). Näytteitä pidettiin blokkauksliuoksessa (5% maitoa laimennettuna Tris-buffered saline, 0,1 % Tween 20 (TBST) tunnin ajan, RT, ravistelijassa. Näytteitä pestiin 5 minuuttia 0,1 ja 0,05 TBS-Tweenissä ennen primääri vasta-aineen inkubaatiota. Käytetty primääri vasta-aine oli CIP2A hiiren monoklonaalinen IgG (CIP2A (2G10-3B5): sc-80659, Santa Cruz Biotechnology, USA), joka laimennettiin suhteessa 1:500 5% rasvattomaan maitoliuokseen ja varastoitiin yön yli pyörivässä sekoittajassa +4°C. Membraani pestiin hyvin ennen sekundääri vasta-aineen lisäämistä. Käytetty sekundäärinen vasta-aine on anti-mouse IgG-HRP (Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, Invitrogen), joka oli laimennettu suhteessa 1:2000 5% rasvattomaan maitoliuokseen, inkubaatioajan ollessa yhden tunnin. Näytteet pestiin jälleen ennen detektio-liuosten (WesternBright ECL Luminol/enhancer solution ja WesternBright Peroxide Chemiluminescent peroxide solution, Advansta, USA) lisäämistä. Tutkittavat proteiinit analysoitiin PVDF-kalvolta tarkastelemalla kemiluminesenssin detektiota Bio-Radin valmistamalla ChemiDoc Imaging system laitteella. Western blot suoritettiin kahteen kertaan, sillä ensin testattiin CIP2A transfektion onnistuminen ja seuraavaksi testattiin näytteiden aktiini-proteiinit.

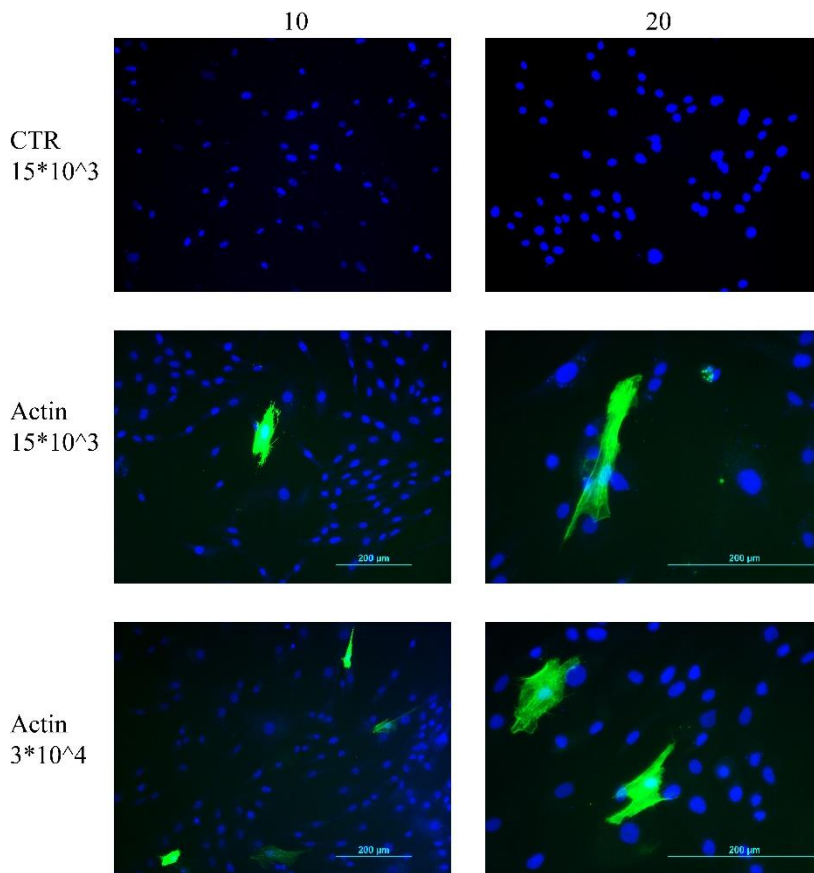
5. Tulokset

5.1 FuGENE transfektiomenetelmän tulokset

Kuvissa 9. ja 10. on FuGENE reagenssilla Actin Chromobodyllä transfektoidut hASC 7/12 ja hASC 4/15 linjan solut järjestyksessä. Kuvien näytteet fiksattiin kahden vuorokauden kuluttua transfektiosta. Kontrollisoluja maljattiin 24-kuoppalevyille 15,000 solua/kuoppa ja näytteiden solumäärät kuoppaa kohti olivat 15,000 ja 30,000 solua/kuoppa. DAPI- värjäyksen jälkeen kuvat otettiin 10x ja 20x suurennoksilla. Kuvan vasemmassa reunassa on merkitty mikä näyte ja mitkä solumäärät ovat kyseessä. CTR tarkoittaa kontrollisoluja, Actin tarkoittaa Actin Chromobodyllä transfektoituja soluja.



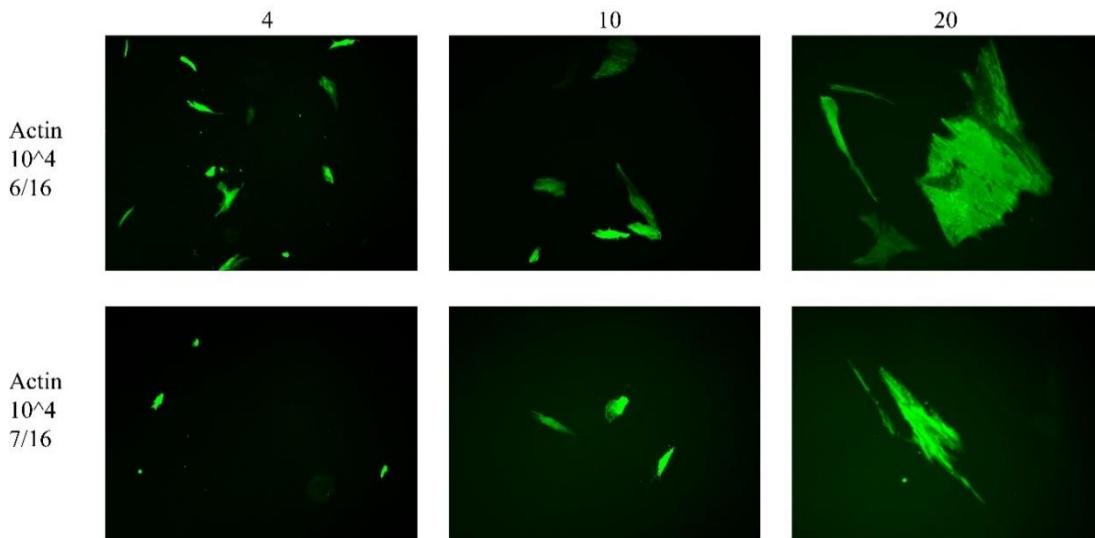
Kuva 9. hACS 7/12 FuGENE reagenssilla transfektoidut solut fiksauksen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Plasmidina käytettiin Actin Chromobodyä.



Kuva 10. FuGENE reagenssilla transfektoidut hASC 4/15 solut 10x ja 20x suurennoksilla. Plasmidina käytettiin Actin Chromobodyä. CTR käytetty solumäärä oli 15,000 solua/kuoppa ja transfektoitavissa näytteissä käytetty solumäärä oli 15,000 ja 30,000 solua/kuoppa.

Kuvista 9. ja 10. havaitaan, että transfektoituneita soluja on vähän, mutta ne harvat solut ovat hyvin kirkkaasti fluoresoivia. Transfektoituneita soluja oli maljalla hyvin harvakseltaan ja kuviin on valittu edustavimmat kohdat.

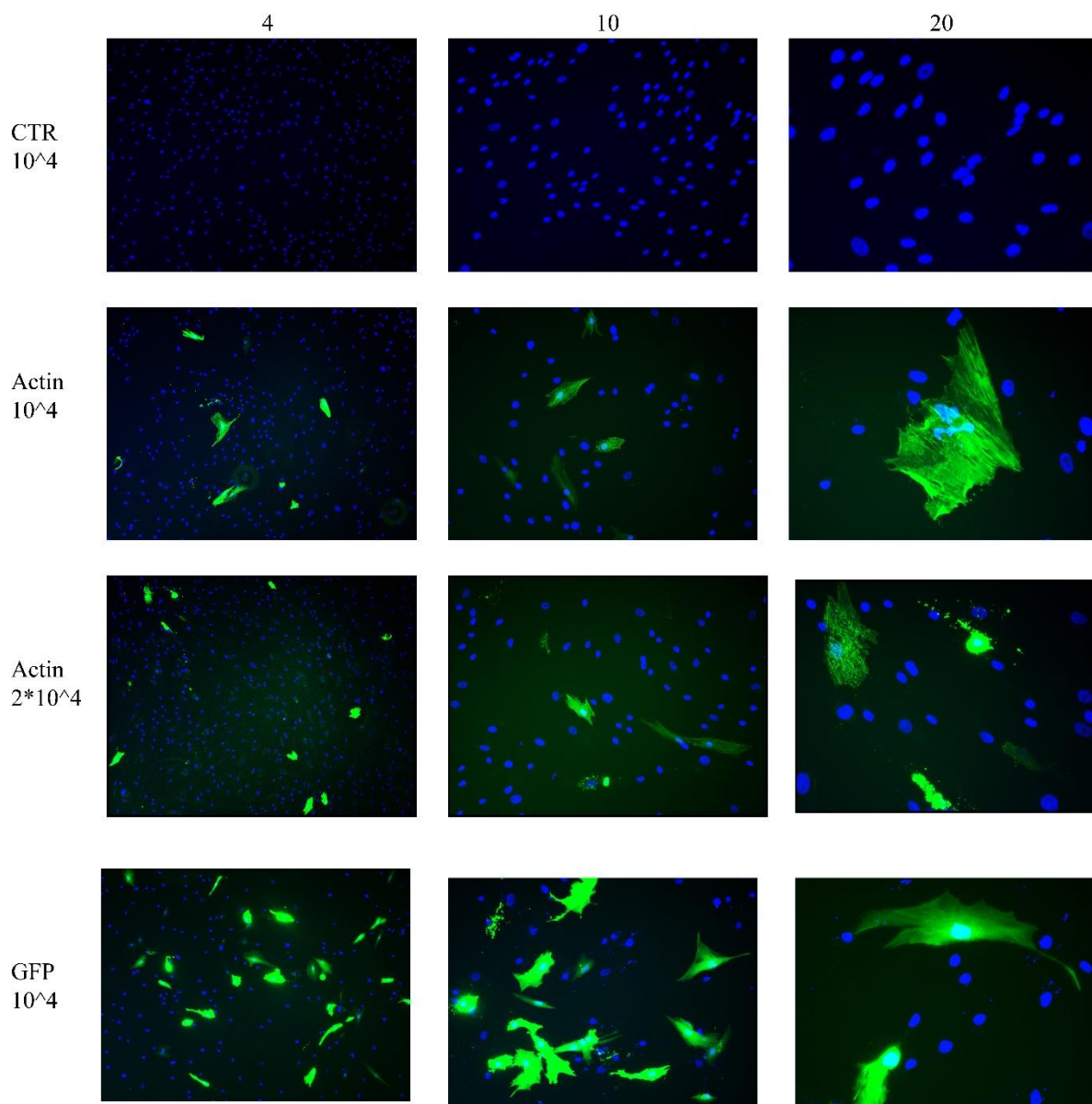
Kuvassa 11. on luuytimen kantasolunäytteet 48 tuntia transfektion jälkeen, ennen solujen fiksaamista ja DAPI-värjäystä. Transfektoituneita soluja oli kuoppalevyn pohjalla vain hyvin harvakseltaan. Fluoresoivia soluja oli ennen fiksausta kohtalaisesti hBMSC 6/16 linjan kohdalla, mutta linjalla hBMSC 7/16 transfektoituneita näytteitä oli hyvin vähän.



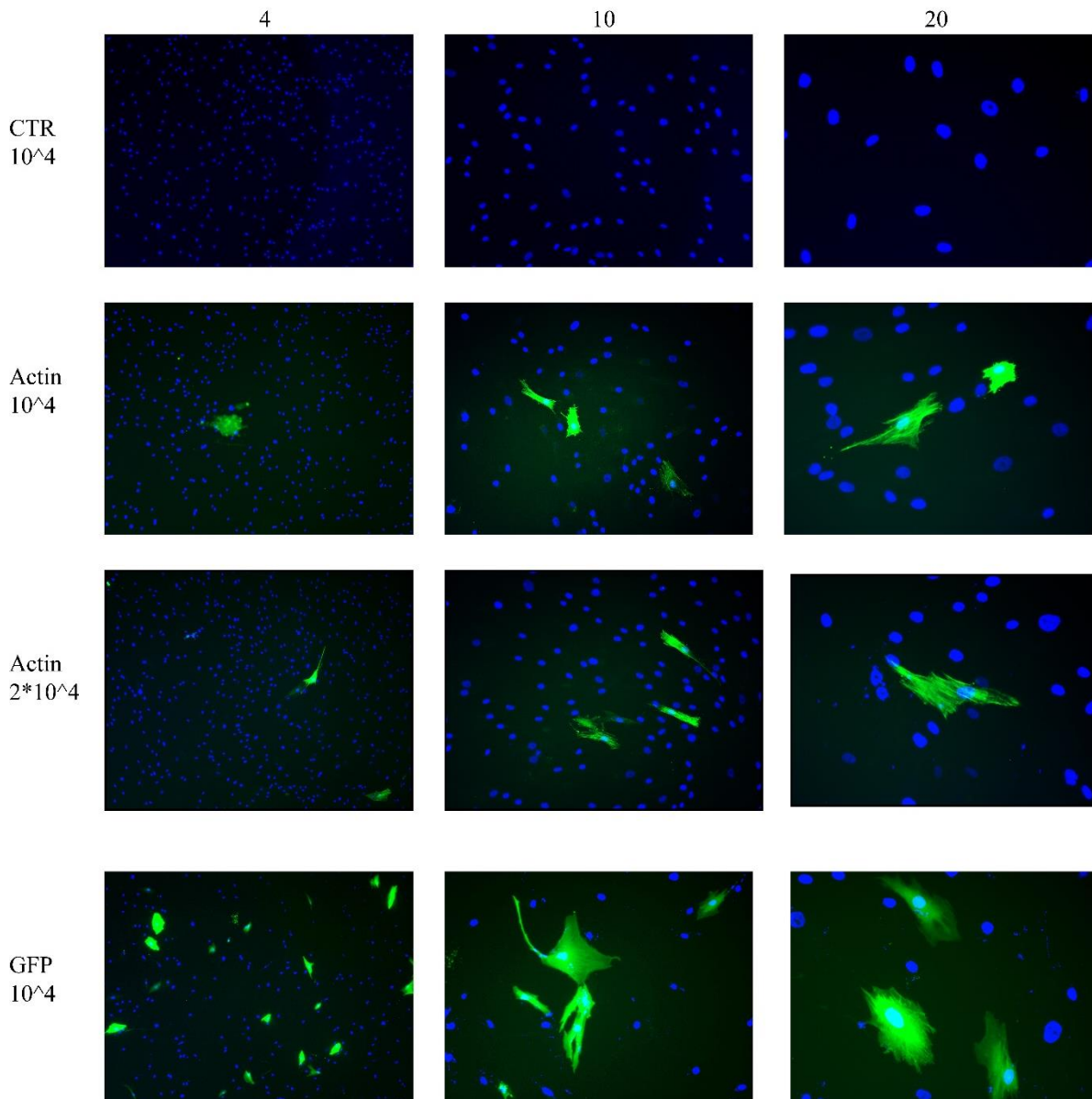
Kuva 11. FuGENE reagenssillä transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut ylärivillä ja hBMSC 7/16 linjan solut alarivillä. Plasmidina käytettiin Actin Chromobodyä. Solut kuvattu 48 h transfektion jälkeen 4x, 10x ja 20x suurennoksilla.

Kuvissa 12. ja 13. on FuGENE reagenssilla transfektoidut luuytimen kantasolut fiksauksen ja värjäyksen jälkeen. Käytetyt solulinjat ovat hBMSC 6/16 ja 7/16 järjestyksessä. Kuvissa käytetyt suurennokset ovat 4x, 10x, ja 20x. Näytteissä käytetyt solumäärät on ilmoitettu kuvan vasemmassa reunassa. Käytetyt solumäärät olivat 24-kuoppalevyllä 10,000 solua/kuoppa tai 20,000 solua/kuoppa. Näytteissä käytettiin Actin Chromobody plasmidia ja pmax-GFP plasmidia, käytetty plasmidi on ilmoitettu kuvien vasemmassa reunassa. pmax-GFP on otettu mukaan vain luuytimen kantasolujen testaukseen. Kuvissa ylimpänä ovat kontrollisolot jotka ovat saaneet transfektiota lukuun ottamatta saman käsittelyn kuin muutkin näytteet. Kuvissa on selvästi havaittavissa, että pmax-GFP plasmidi on tuottanut paljon enemmän fluoresoivia soluja verrattuna Actin Chromobodyllä transfektoiduihin näytteisiin.

hBMSC 6/16 FuGENE



Kuva 12. FuGENE reagenssillä transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Kuvan vasemmassa reunassa on ilmoitettu käytetty plasmidi, Actin tarkoittaa Actin Chromobodyä ja GFP puolestaan pmaxGFP:tä. Kuvat otettu 4x, 10x ja 20x suurennoksilla.

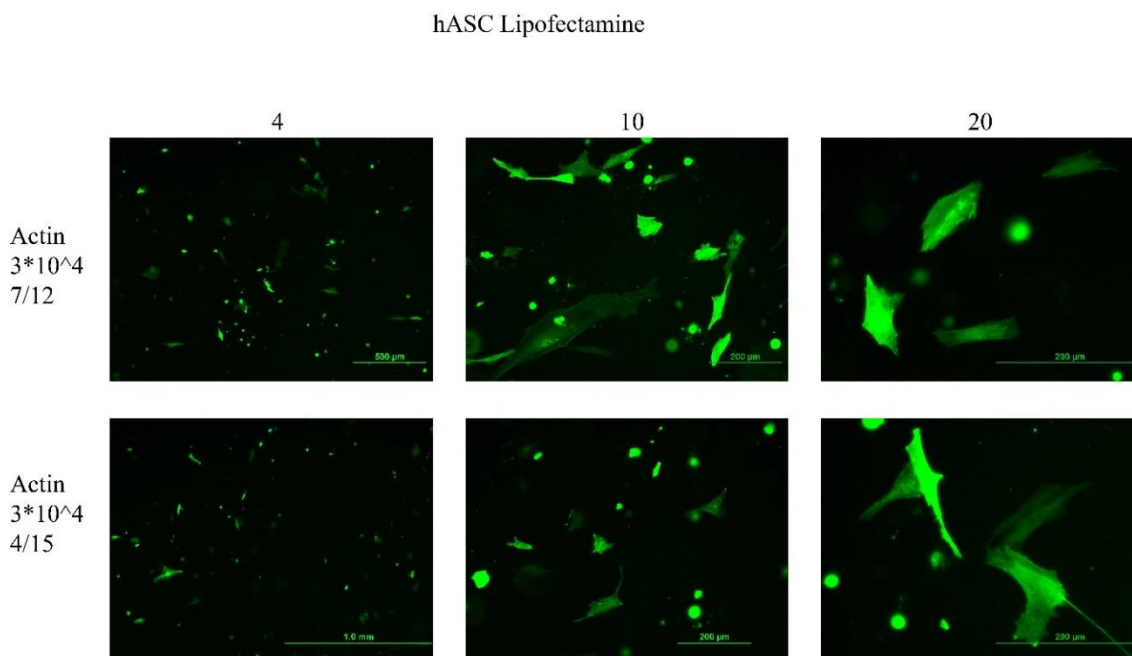


Kuva 13. FuGENE reagenssillä transfektoidut hBMSMC 7/16 linjan solut fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Kuvan vasemmassa reunassa on ilmoitettu käytetty plasmidi, Actin tarkoittaa Actin Chromobodyä ja GFP puolestaan pmaxGFP:tä. Kuvat otettu 4x, 10x ja 20x suurennoksilla.

Kuvissa 12. ja 13. nähdään melko harvakseltaan transfektoituneita soluja etenkin hBMSMC 7/16 linjan kohdalla. 10x suurennoksella otetuissa kuvissa nähdään, että transfektoituneet solut ovat aika pienikokoisia. Sinisten tumien perusteella kuitenkin nähdään, että soluja on kuoppalevyllä runsaasti. pmaxGFP:tä käyttäessä transfektoituneita soluja FuGENE menetelmällä oli huomattavasti enemmän kuin Actin Chromobodyä käyttäessä. Verrattaessa kuvia 12. ja 13. kuvaan 11. nähdään, että etenkin hBMSMC 6/16 linjan fluoresoivien solujen määrä väheni solujen fiksauksen jälkeen.

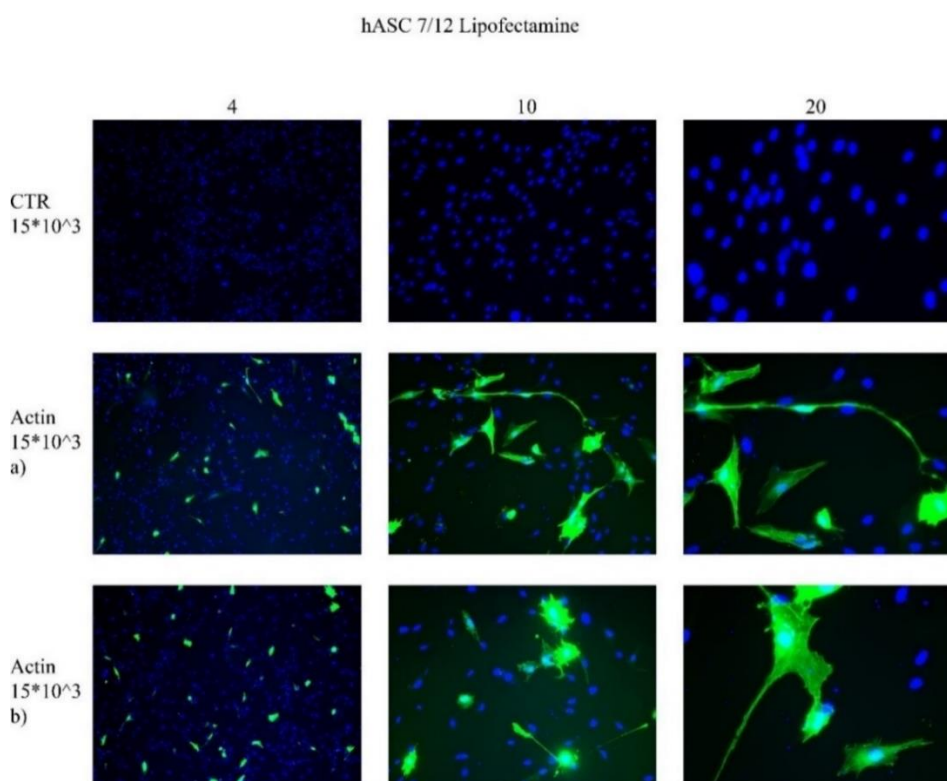
5. 2 Lipofectamine transfektiomenetelmän tulokset

Lipofectamiinilla transfektoituvat solut kuvattiin fiksaamisen ja värjäämisen jälkeen fluoresenssimikroskoopilla käyttäen suurennoksia 4x, 10x ja 20x. Kuvapaneeleissa 14-17 a) tarkoittaa, että käytetty pDNA/Lipofectamine3000 reagenssin suhde on 1:1,5 ja b) tarkoittaa samoilla molekyyleillä vahvempaa suhdetta 1:3. Kontrollinäytteiden solut ovat saaneet transfektiota lukuun ottamatta saman käsittelyn kuin muut näytteet. Kuvassa 14. on Lipofectaminella transfektoidut elävät rasvan kantasolut 48 tuntia transfektion jälkeen. Kuvan ylärivillä on hASC 7/12 linjan solut ja alarivillä on 4/15 linjan solut. Molemmilla solulinjoilla nähdään runsaasti transfektoituneita soluja. Osa fluoresoivista soluista ovat hyvin intensiivisen kirkkaita ja osa soluista ovat vain heikosti fluoresoivia.

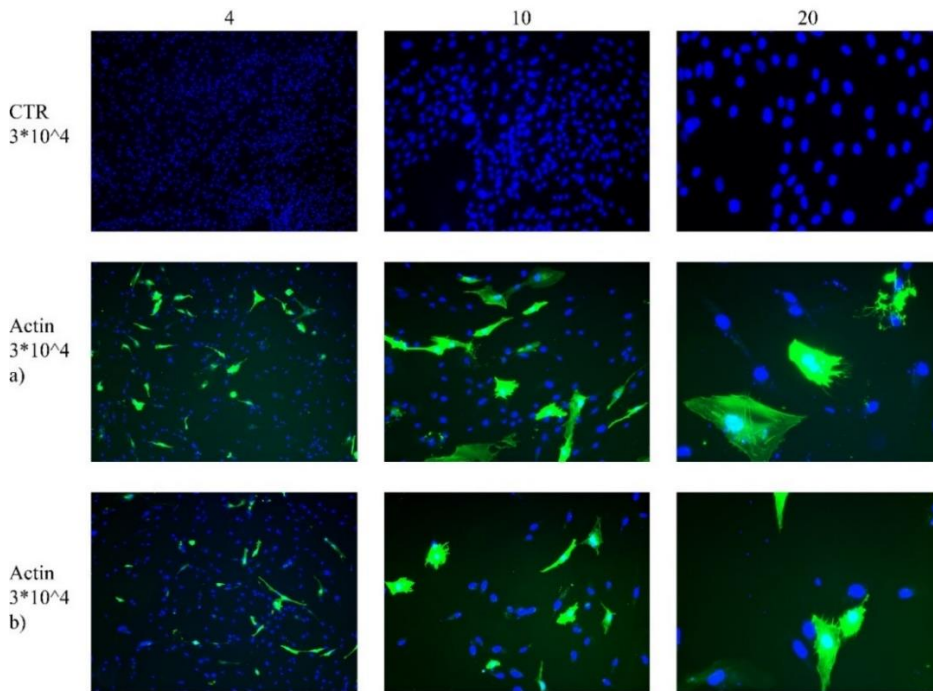


Kuva 14. hASC näytteet 48 tuntia Lipofectamine-transfektion jälkeen. Ylärivillä hASC 7/12 ja alarivillä hASC 4/15 linjan solut. Transfektioon käytettiin Actin Chromobody-plasmidia.

Kuvan 15. hASC 7/12 linjan solut maljattiin 24-kuoppalevylle 15,000 solua/kuoppa. Näillä rasvan kantasoluilla on käytetty kahta eri Lipofectamine3000 reagenssin pitoisuutta. Kuvassa 15. nähdään että 15,000 solumäärällä pDNA/Lipofectamine 1:3 (kohta b) on tuottanut hiukan enemmän transfektoituneita soluja kuin pDNA/Lipofectamine 1:1,5 (kohta a). Kuvassa 16. on esitettyä hASC 7/12 soluilla saadut tulokset, kun käytössä ollut solumäärä oli 30,000 solua/kuoppa. Kuvat 15. ja 16. otettiin 48 tuntia transfektion jälkeen fiksatuista ja DAPI:lla värjätystä näytteistä.



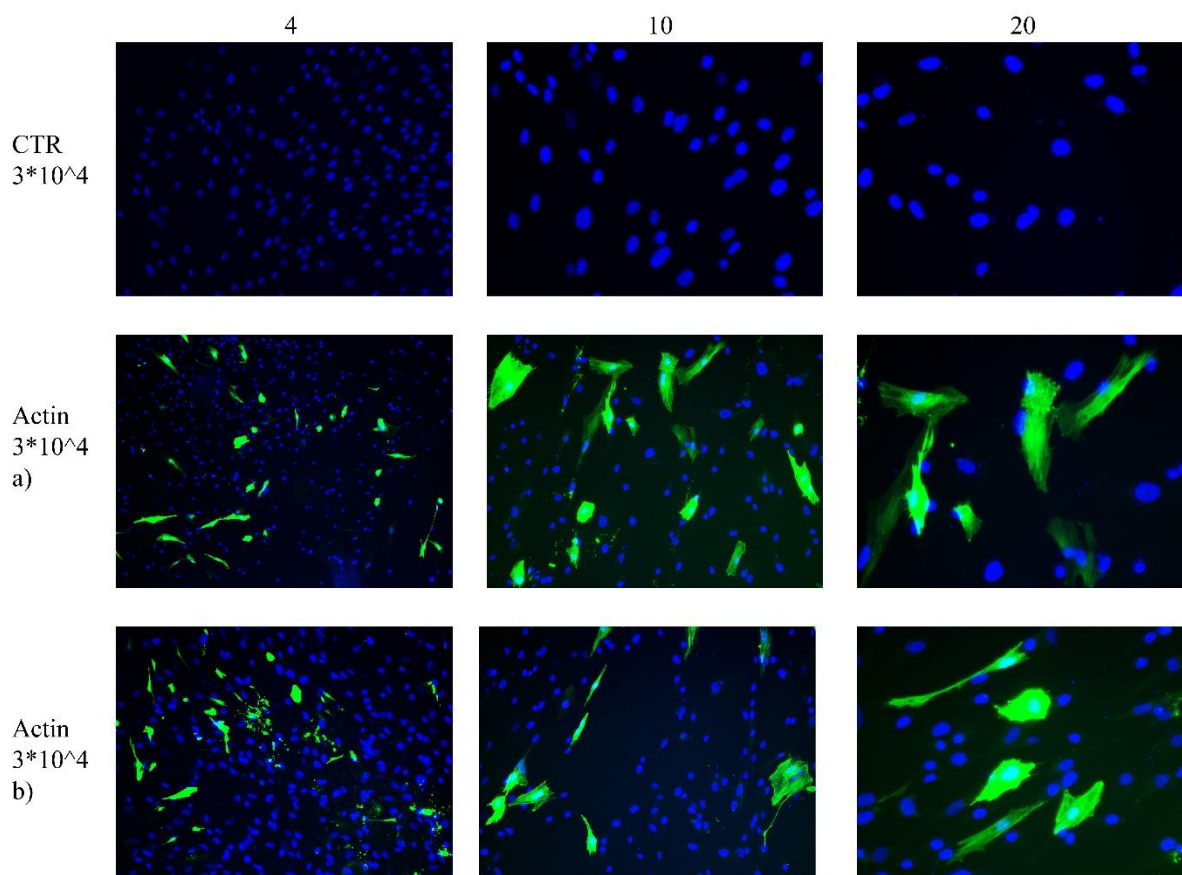
Kuva 15. hASC 7/12. Näytteiden solumäärä 15000 solua/kuoppa. Käytetyt suurennokset: 4x, 10x ja 20x. CTR: kontrollisolut, a: 1:1,5 DNA/Lipofectamine3000, b: 1:3 DNA/Lipofectamine3000. Transfektiossa käytettiin plasmidina Actin Chromobodyä.



Kuva 16. hASC 7/12. Näytteiden solumäärä 30000 solua/kuoppa. Käytetyt suurennokset: 4x, 10x ja 20x. CTR: kontrollisolut, a: 1:1,5 DNA/Lipofectamine3000, b: 1:3 DNA/Lipofectamine3000. Transfektiossa käytettiin plasmidina Actin Chromobodyä.

Kuvassa 17. on esitetty hASC 4/15 solujen transfektion tulokset fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Käytetty solumäärä näillä soluilla oli 30,000 solua/kuoppa. Actin Chromobodyllä transfektoituneita soluja on nähtävissä suhteellisen paljon ja solujen aktiinitukiranka on pääosin hyvin havaittavissa. Lipofectamiinin pitoisuus (kohdassa a: pDNA/Lipofectamine3000 suhteessa 1:1,5 ja kohdassa b: pDNA/Lipofectamine3000 suhteessa 1:3) ei vaikuttanut transfektoituneiden solujen määrään näytteissä.

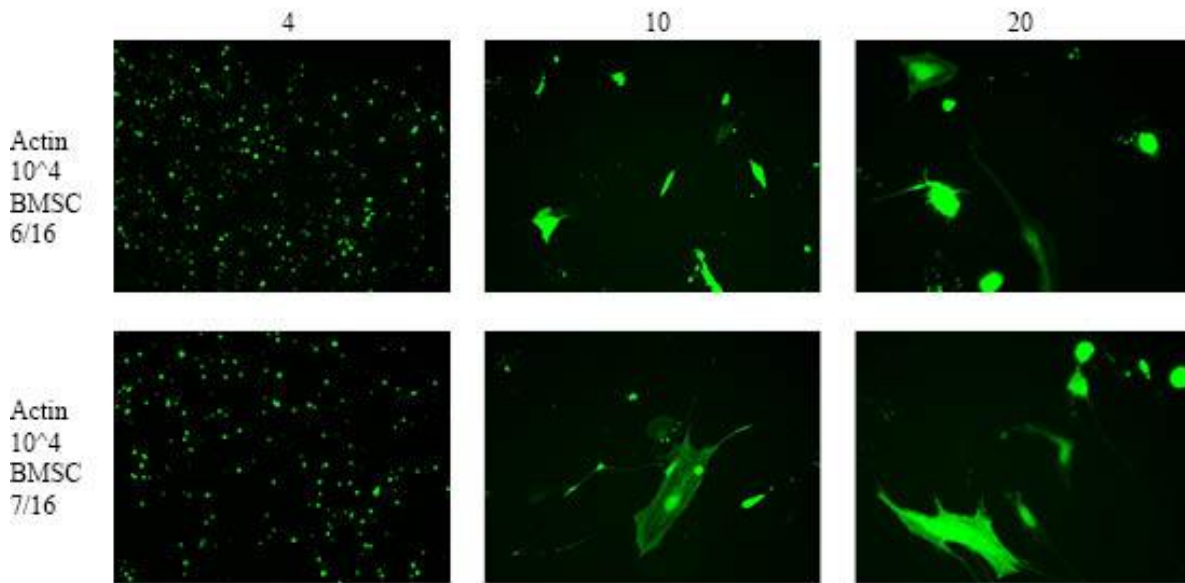
hASC 4/15 Lipofectamine



Kuva 17. Actin Chromody-plasmidilla transfektoidut hASC 4/15 linjan solut. Näytteiden solumäärä 30000 solua/kuoppa. Käytetyt suurennokset: 4x, 10x ja 20x. CTR: kontrollisolut, a: 1:1,5 DNA/Lipofectamine3000, b: 1:3 DNA/Lipofectamine3000.

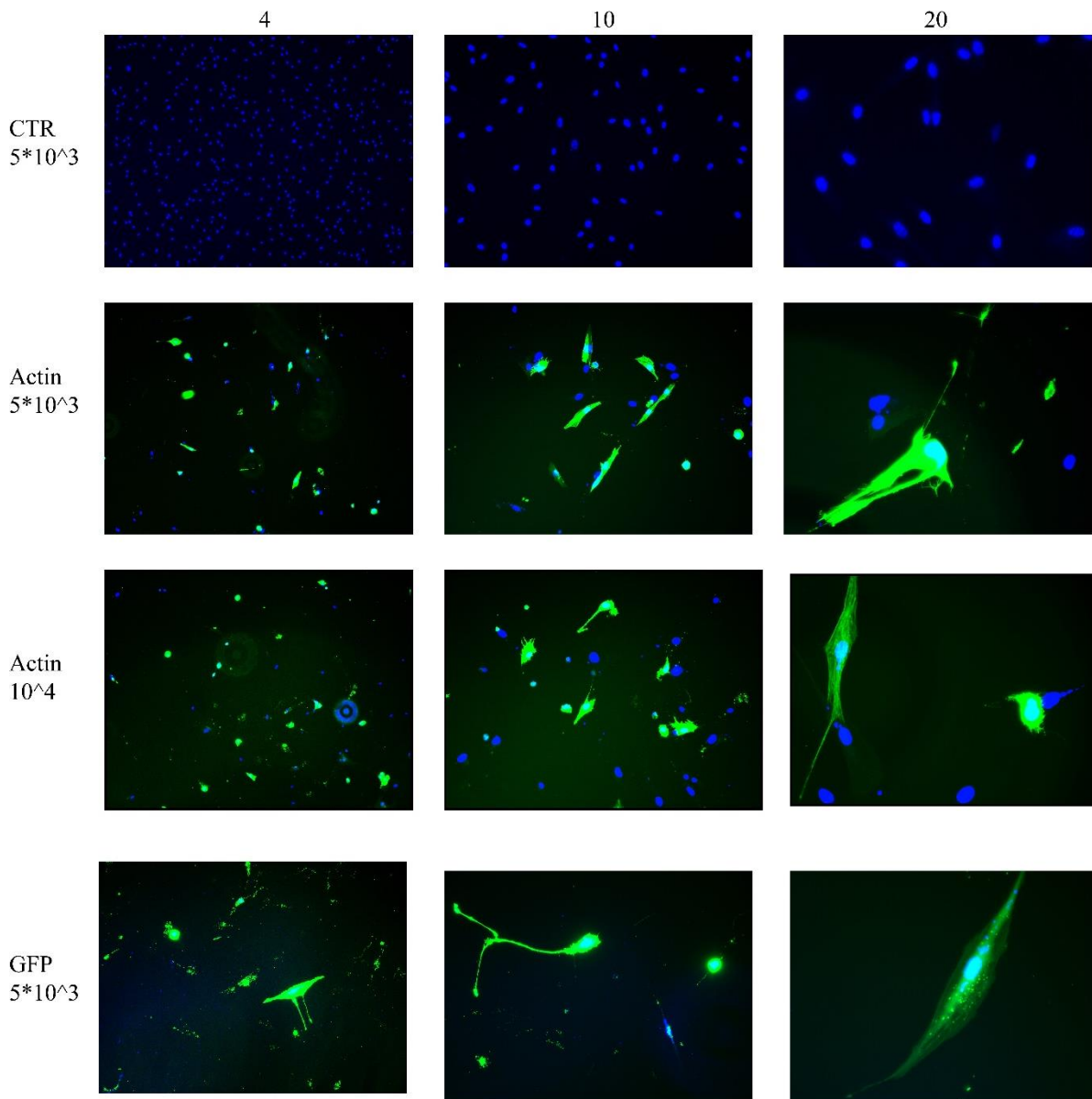
Lipofectaminella transfektoidut luuytimen kantasoluja on näkyvillä kuvassa 18. Kuvat ovat otettu elävistä soluista 48 tuntia transfektion jälkeen. Molemmilla solulinjoilla kaikilla suurennoksilla nähdään paljon fluoresoivia soluja. Suurennoksilla 10x ja 20x nähdään myös, että osa soluista on hyvin pieniä tai pyöreitä, eikä selkeää aktiinitukirankaa ole näkyvissä monessakaan solussa. Kuvissa 19. ja 20. nähdään luuytimen kantasoluilla saadut transfektion tulokset Lipofectamine menetelmällä fiksauksen ja DAPI- värjäyksen jälkeen. Käytetyt solumäärät kokeessa olivat 5,000 solua/kuoppa ja 10,000 solua/kuoppa (24-kuoppalevyllä), solumäärä näkyy kuvan vasemmassa reunassa. Kuvassa 19. nähdään hBMSC 6/16 linjan solujen tulokset ja kuvassa 20. vastaavasti on hBMSC 7/16 linjan solut. Fluoresoivien solujen määrä on melko tasainen kaikissa luuytimen kantasoluissa, mutta solujen koko ja fluoresoivan värin intensiivisyys vaihtelevat paljon.

hBMSC Lipofectamine



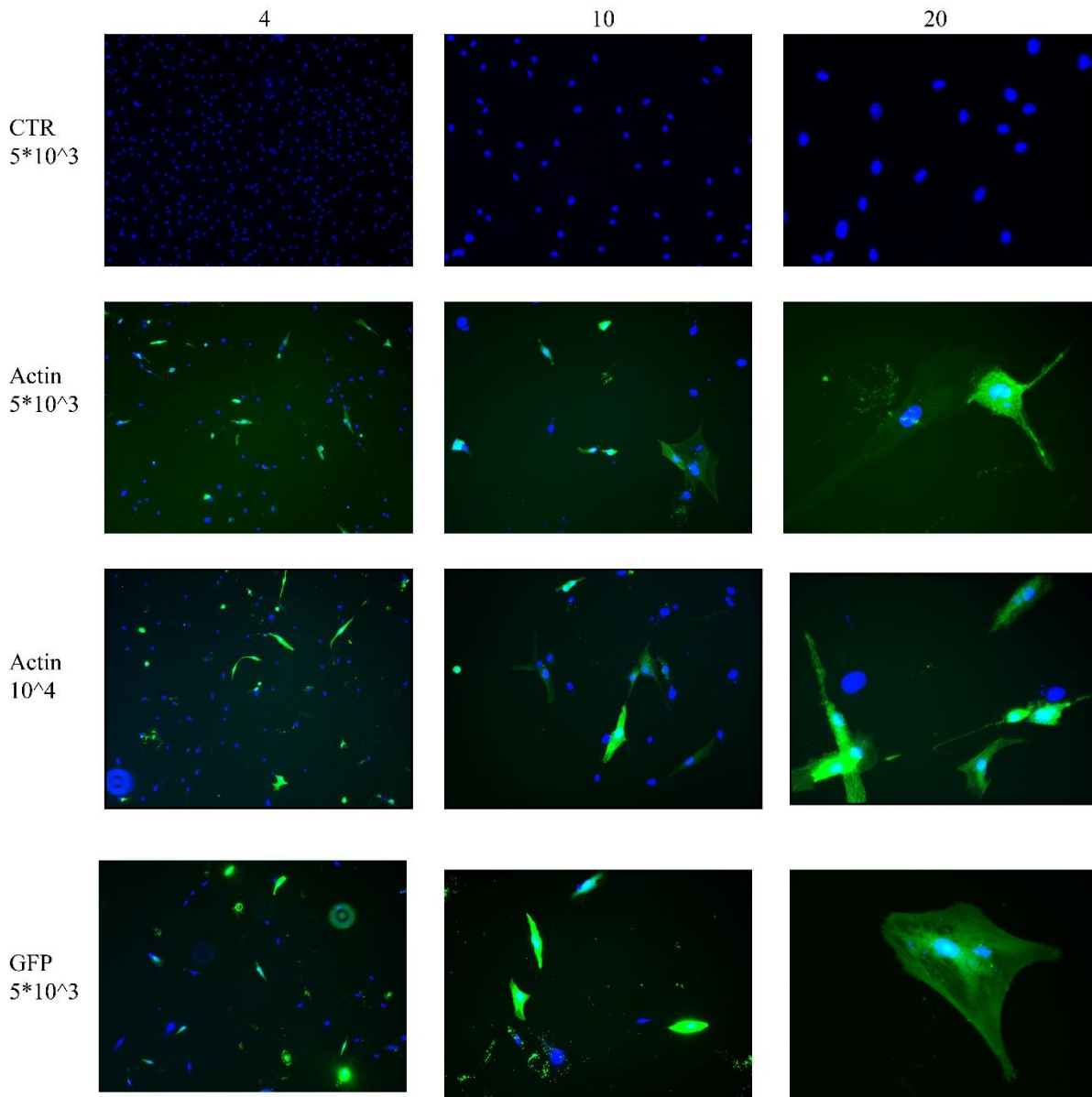
Kuva 18. Lipofectaminella transfektoidut elävät hBMSC solut 48 tuntia transfektion jälkeen. Actin Chromobodyllä transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut kuvan ylälaidassa ja hBMSC 7/16 linjan solut kuvan alalaidassa. Käytetyt suurennokset: 4x, 10x ja 20x.

hBMSC 6/16 Lipofectamine



Kuva 19. Lipofectaminella transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Vasemmasta reunasta nähdään käytetty solumäärä ja plasmidi: CTR: ei transfektiota, Actin: Actin Chomobody ja GFP: pmaxGFP. Kuvat otettiin suurennoksilla 4x, 10x ja 20x.

hBMSC 7/16 Lipofectamine

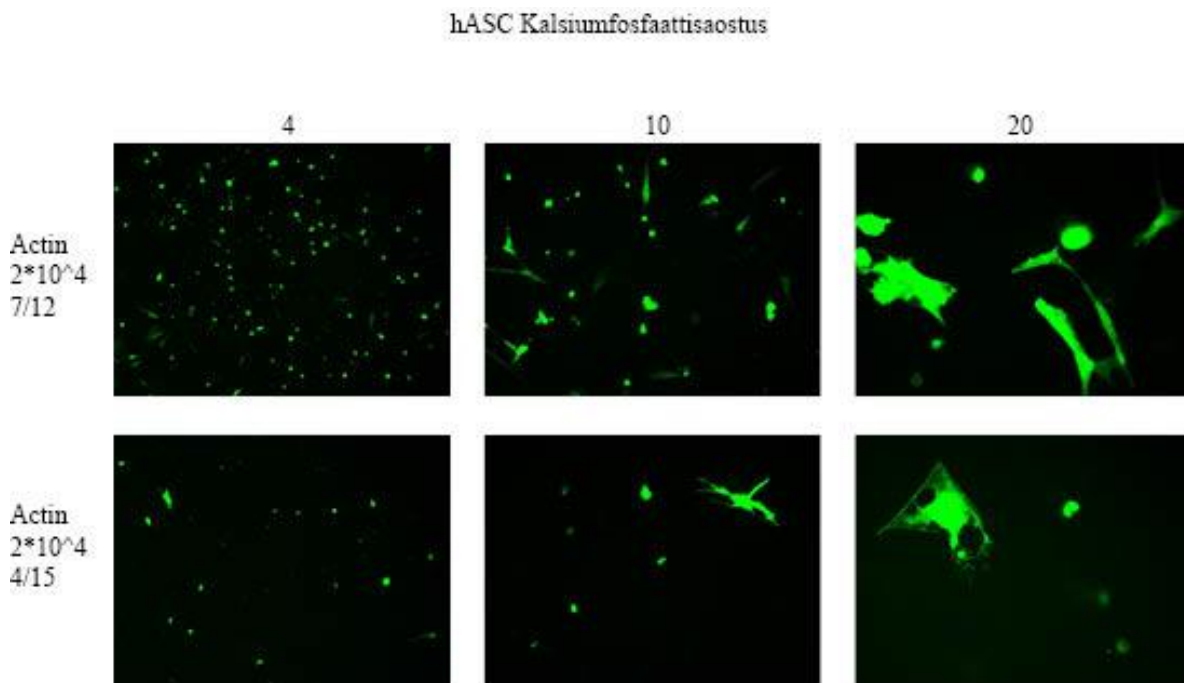


Kuva 20. Lipofectaminella transfektoidut hBMSC 7/16 linjan solut fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Vasemmasta reunasta nähdään käytetty solumäärä ja plasmidi: CTR: ei transfektiota, Actin: Actin Chomobody ja GFP: pmaxGFP. Kuvat otettiin suurennoksilla 4x, 10x ja 20x.

Kuvista 14-20. voidaan nähdä, että transfektio Lipofectamine reagenssilla on onnistunut sekä rasvan että luuytimen kantasoluilla molemmilla solulinjoilla. Lipofectaminella transfektoitujen solujen määrä ei eronnut merkittävästi, vaikka menetelmää testattiin eri solumäärillä ja kahdella eri Lipofectamine pitoisuudella. Tällä menetelmällä fluoresoivien solujen määrä ei laskenut fiksauksen jälkeen huomattavasti.

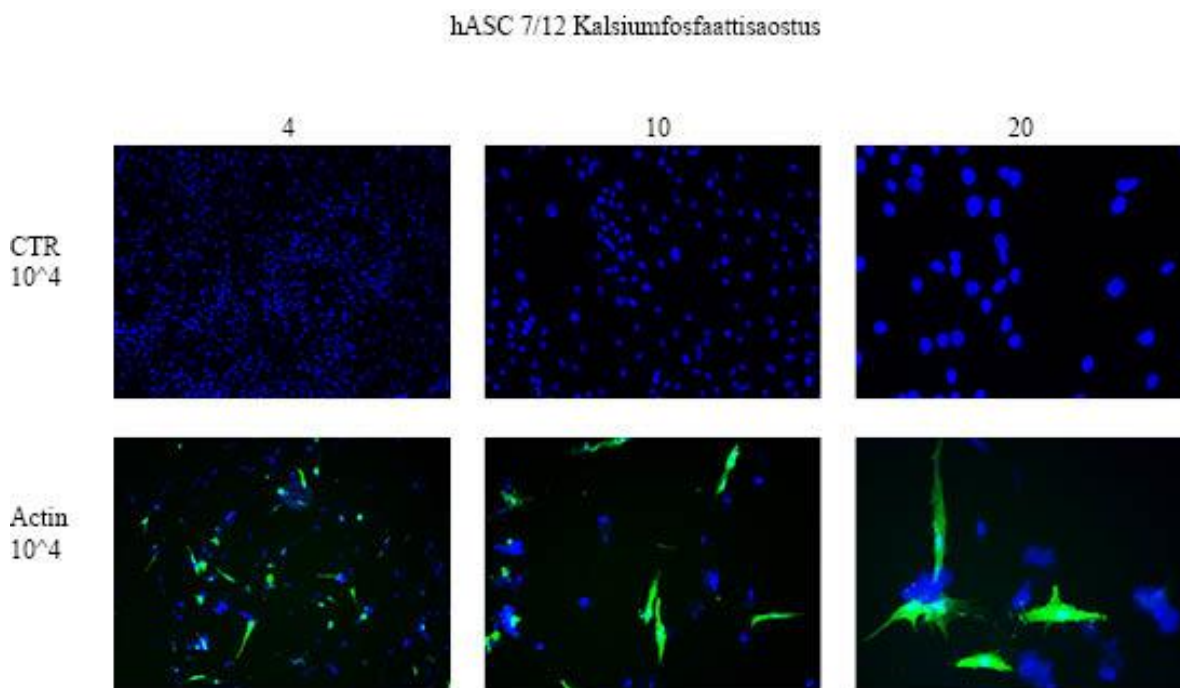
5.3 Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmän tulokset

Transfektoidut solunäytteet kuvattiin kahdesti fluoresenssimikroskoopilla, ensimmäisen kerran ennen solujen fiksausta ja värjäystä (kaksi vuorokautta transfektion jälkeen) ja toisen kerran niiden jälkeen. Kuva 21. on otettu elävistä rasvan kantasoluista, kun transfektio on suoritettu käyttäen kalsiumfosfaattisaostusmenetelmää ja plasmidina Actin Chromobodyä. Näytteillä käytettiin solumäärää 20,000 solua/kuoppa. Etenkin hASC 7/12 linjan soluilla transfektio on tuottanut paljon fluoresoivia soluja, mutta solulinjalla hASC 4/15 transfektoituneita soluja on hyvin harvakseltaan. Kuvassa 21. ylärivillä on hASC 7/12 linjan näytteet ja alarivillä hASC 4/15 linjan solut. Vihreä fluoresoiva väri on hyvin intensiivistä, mutta silti solujen aktiinitukiranka ei ole selkeästi havaittavissa näytteissä.



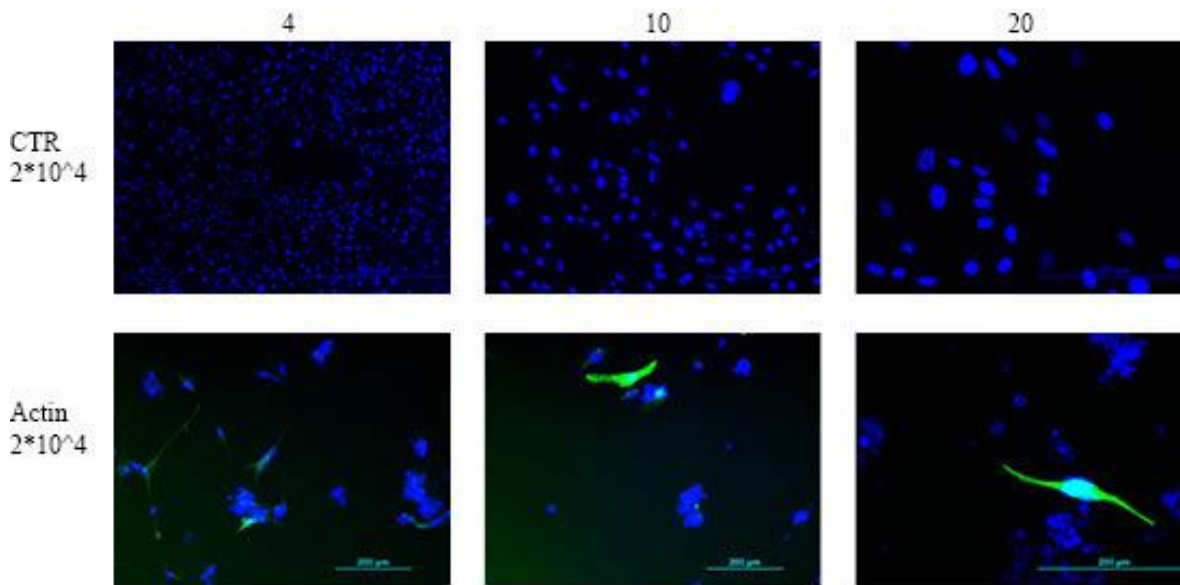
Kuva 21. Elävät hASC solut kuvattu 48 tuntia transfektion jälkeen. Transfektio on suoritettu kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä ja plasmidina on käytetty Actin Choromobodyä. Ylärivillä on hASC 7/12 linjan solut ja alarivillä hASC 4/15 linjan solut.

Kuvissa 22. ja 23. on esitetty tulokset rasvan kantasolujen transfektiosta kalsiumfosfaattisaostuksella. Rasvan kantasoluilla on käytetty plasmidina vain Actin Chromobodyä. Kuvat on otettu fiksaamisen ja DAPI-värjäyksen jälkeen. Molemmille linjoille tehtiin erilliset testit käyttäen sekä 10,000 että 20,000 solua/kuoppa, mutta tässä työssä on näytetty molemmista testeistä vain paremmat tulokset. Tässä menetelmässä maljattu solumäärä kuoppaa kohden ei tuottanut eroa transfektoitujen solujen määrässä. Kuvassa 22. esiintyy kohtalaisen hyvin transfektoituneita rasvan kantasoluja ja niiden fluoresoiva väri on hyvin kirkas. Transfektoituneet solut ovat hyvin pienikokoisia ja aktiinitukiranka ei erotu selkeästi.



Kuva 22. Kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä transfektoidut hASC 7/12 linjan solut. Transfektoointiin käytettiin plasmidina Actin Chromobodyä. Näytteitä on 10,000 solua/kuoppa. Kuvat otettiin fluoresenssimikroskoopilla suurennoksilla 4x, 10x ja 20x.

ASC 4/15 Kalsiumfosfaattisaostus

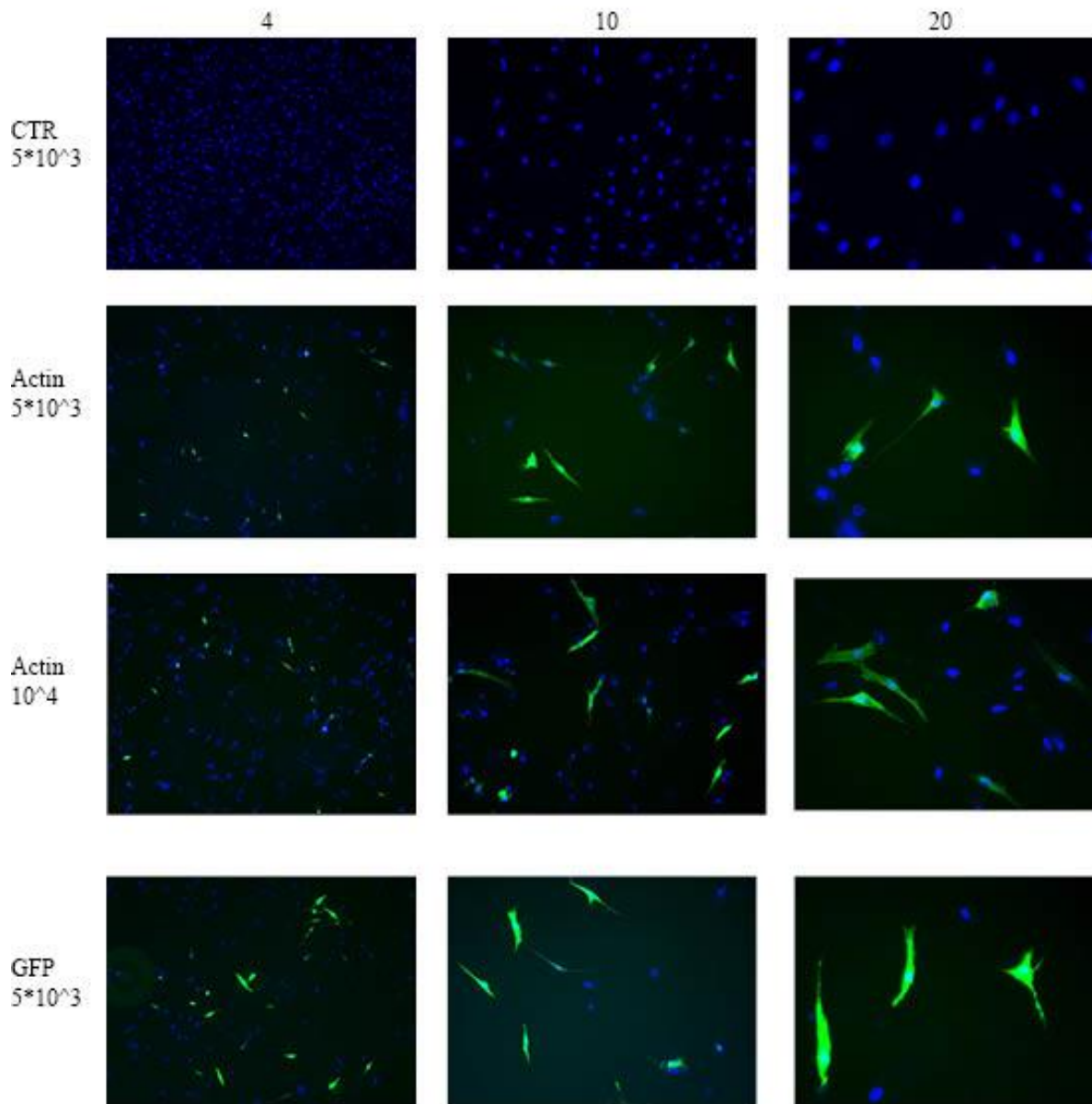


Kuva 23. Kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä transfektoidut hASC 4/15 linjan solut. Transfektioon käytettiin plasmidina Actin Chromobodyä. Näytteitä on 20,000 solua/kuoppa. Kuvat otettiin fluoresenssimikroskoopilla suurennoksilla 4x, 10x ja 20x.

hASC näytteillä linjakohtaiset erot ovat havaittavissa kuvan 23. kohdalla. hASC 4/15 linjan soluja oli havaittavissa hyvin vähän jo ennen solujen fiksausta, mutta sen jälkeen enää vain muutama yksittäinen kappale. Soluja oli kuoppalevyllä todella harvassa molemmissa rinnakkaisissa näytteissä, molemmilla solupitoisuuksilla. Ne harvat yksittäiset transfektoituneet solut ovat kirkkaasti näkyvissä, mutta hyvin pienikokoisia.

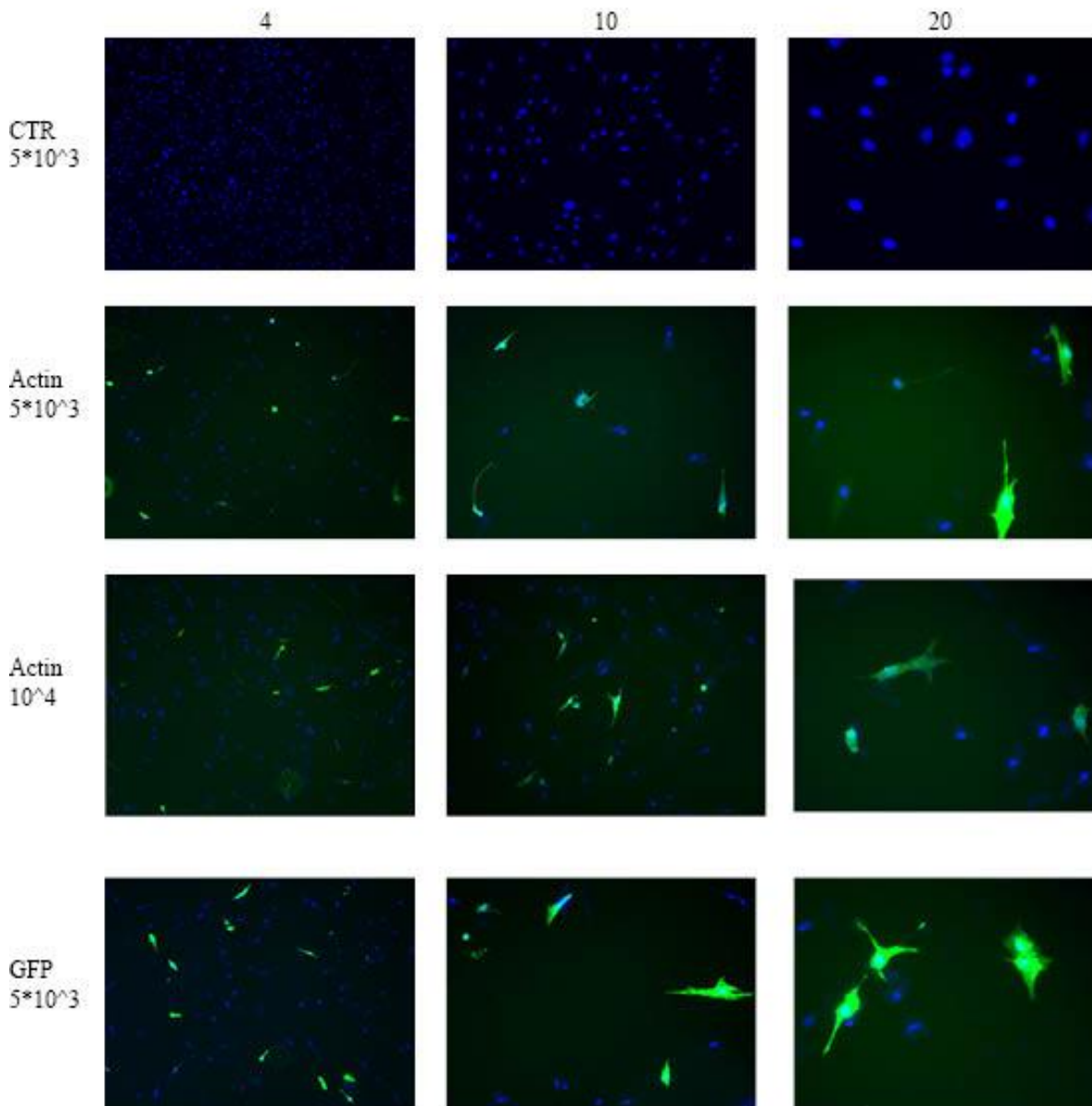
Kuvissa 24. ja 25. on fiksauksen jälkeen kuvatut kalsiumfosfaattisaostuksella transfektoidut hBMSC 6/16 ja 7/16 linjan solut järjestyksessä. Soluja on maljattu kuoppalevyille 5,000 tai 10,000 solua/kuoppa ja käytetty solumäärä on nähtävillä kuvien vasemmassa laidassa. Luuytimen kantasoluille on transfektoitu sekä Actin Chromobodyä että pmaxGFP:tä ja kuvien vasemmasta laidasta nähdään mikä plasmidi on kyseessä.

hBMSC 6/16 Kalsiumfosfaattisaostus



Kuva 24. Kalsiumfosfaattisaostus- menetelmällä transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut fiksauksen jälkeen. Transfektioon käytettiin plasmideina Actin Chromobodyä ja pmaxGFP:tä. Soluja maljattiin 5,000 tai 10,000 solua/kuoppa.

hBMSC 7/16 Kalsiumfosfaattisaostus



Kuva 25. Kalsiumfosfaattisaostus- menetelmällä transfektoidut hBMSC 7/16 linjan solut fiksauksen jälkeen. Transfektioon käytettiin plasmideina Actin Chromobodyä ja pmaxGFP:tä. Soluja maljattiin 5,000 tai 10,000 solua/kuoppa.

Luuytimen kantasoluilla on molemmilla solulinjoilla paljon kontrollisoluja, mutta transfektionäytteissä solujen määrä on huomattavasti vähentynyt. Erityisesti 24-kuoppalevyille maljatuissa näytteissä, joissa on käytetty solumääränä 5,000 kpl/kuoppa, tumien perusteella soluja on todella vähän jäljellä transfektion jälkeen. Luuytimen kantasoluilla pmaxGFP plasmidi on tuottanut enemmän transfektoituneita soluja kuin Actin Chromobodyllä testattaessa, mutta tämän menetelmän kohdalla ero on hyvin pieni. Solut ovat värjäytyneet hyvin vaihtelevasti, osa soluista on erittäin

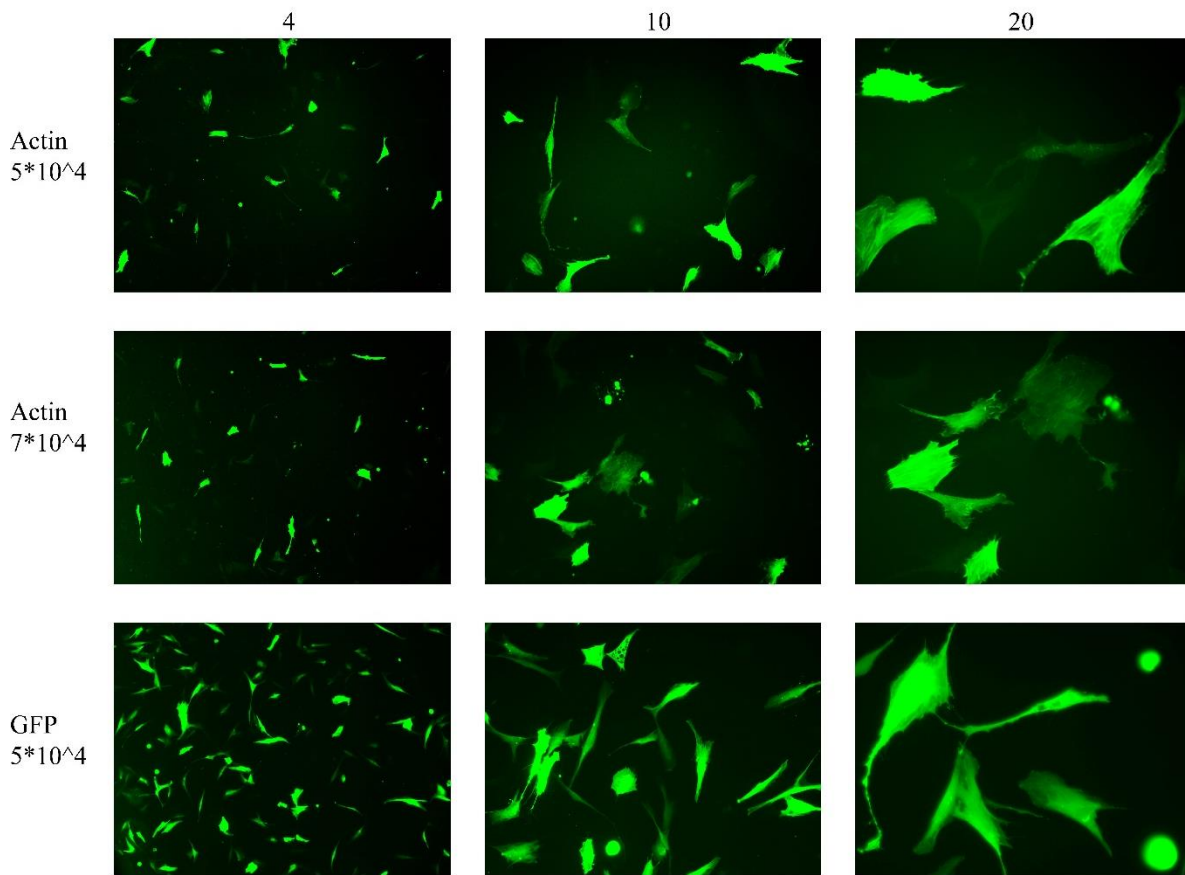
kirkkaasti fluoresoivia, mutta mukana on myös hyvin himmeästi fluoresoivia soluja. Näytteiden kuvaaminen oli haastavaa, sillä transfektio oli näytteistä onnistunut vain hyvin paikallisesti.

5.4 Elektroporaatiomenetelmän tulokset

Elektroporaatiota testattaessa transfektoituja solunäytteitä seurattiin kuuden päivän ajan ja solut kuvattiin yhteensä neljä kertaa fluoresenssimikroskoopilla. Kuvaukset tehtiin 1, 3 ja 6 päivän jälkeen transfektioista katsottuna. Solunäytteille ei testauksen aikana vaihdettu mediumia eikä luuytimen kantasoluille lisätty kasvutekijä hFGF2:sta. Näytteet pidettiin hyvin valolta suojattuna koko testauksen ajan. Kuuden päivän päästä transfektioista solunäytteet fiksattiin 4 % PFA:lla ja värjättiin DAPI:lla. Neljäs kuvaus suoritettiin fiksauksen ja värjäyksen jälkeen. Tässä työssä on mukana vain osa elektroporaationäytteiden kuvista. Kuvissa 26., 28., 30. ja 32. näytteet on kuvattu 24 tuntia elektroporaation jälkeen. DAPI-värjäyksen jälkeen saadut tulokset ovat nähtävissä kuvissa 27., 29., 31. ja 33. Molemmilla kantasolutyypeillä transfektioon on käytetty sekä Actin Chromobodyä että pmaxGFP-plasmidia. hASC soluilla on tätä menetelmää testattu kahdella eri solupitoisuudella: 50,000 ja 70,000 solua/kuoppa 24-kuoppalevyllä. hBMSC soluilla kaikki testit elektroporaatiossa on tehty 125,000 solua kuoppaa kohti, kun käytössä oli 6-kuoppalevy.

Näytteillä haluttiin seurata transfektion pysyvyyttä soluissa. Kaikissa näytteissä oli havaittavissa fluoresoivan värin heikentymistä ajan kuluessa. Fluoresoivien solujen osuus väheni sekä määrällisesti että signaalin intensiivisyydeltä. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet vähenivät ja haalistuivat selkeästi enemmän kuin pmaxGFP:llä sekä luuytimen että rasvan kantasoluilla. Etenkin kuvissa (26., 28., 30. ja 32.), jotka on otettu 24 h elektroporaation jälkeen voidaan nähdä, että soluja on värjäytynyt eri intensiteetillä. Samassa kuvassa on nähtävissä sekä himmeitä että kirkkaita soluja. Kaikilla näytteillä transfektoituneiden solujen määrät olivat tässä menetelmässä hyviä. Elektroporaatio saa aikaan tehokkaan transfektion, vaikka onkin havaittavissa, ettei vaikutus ole aina kovin pitkäaikainen. Transfektoituneet solut olivat levittäytyneet tasaisesti koko kuoppalevyn alalle. Rasvan kantasoluilla elektroporaatio testattiin kahdella eri solumäärällä kuoppaa kohden, mutta tuloksissa ei ole juurikaan eroavaisuuksia, vaikka solumäärää on muutettu. Solujen värjäytynyt aktiinitukiranka on hyvin havaittavissa varsinkin kuvissa 26. ja 28.

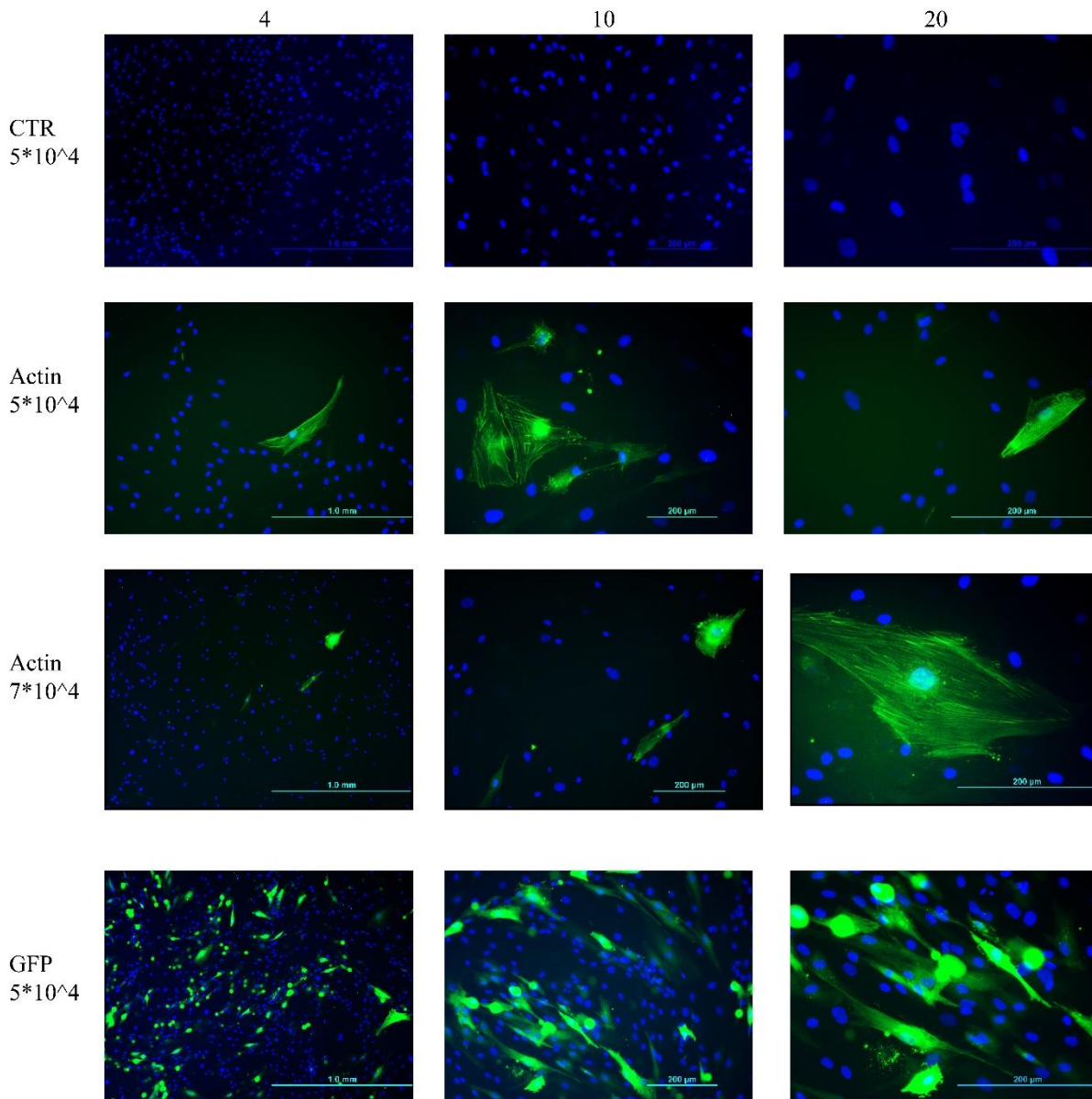
hASC 7/12 Elektroporaatio



Kuva 26. hASC 7/12 linjan solut elävänä 24 tuntia elektroporaation jälkeen. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet kuvan ylä- ja keskirivillä ja alarivillä on pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet. Näytteiden solumäärät 24-kuoppalevyn kuoppaa kohti oli 50,000 tai 70,000 solua.

Kuvassa 27. pmaxGFP:llä transfektoituneita soluja on edelleen havaittavissa paljon, mutta solujen muoto on pyöristynyt ja pienentynyt verrattuna aikaisempiin saman solulinjan elektroporaatiokuvaan. Actin Chromobodyllä transfektoiduissa näytteissä puolestaan havaittiin edelleen selkeä tukiranka, mutta fluoresoivia soluja oli enää todella harvassa. Kuvan solut ovat fiksattu kuusi päivää transfektion jälkeen ja kuvattu uudestaan seuraavana päivänä.

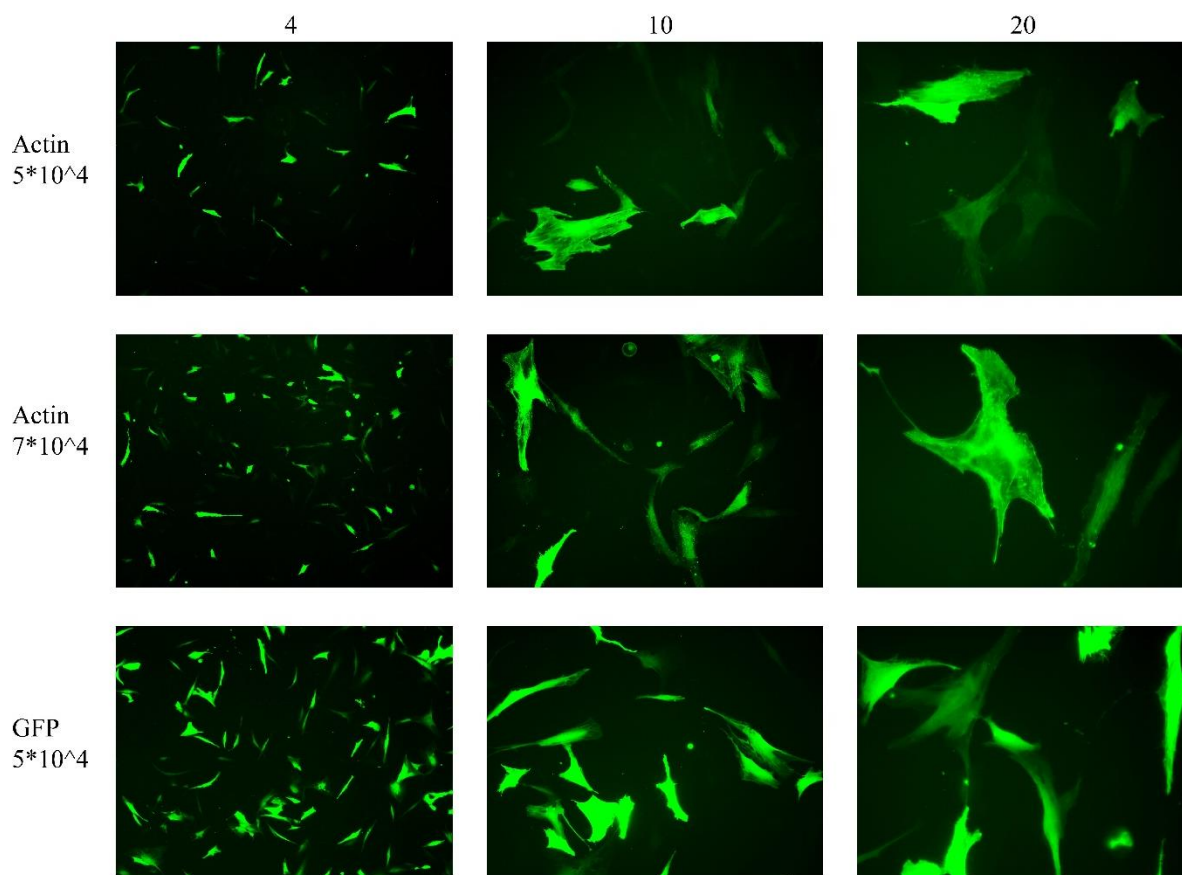
hASC 7/12 Elektroporaatio



Kuva 27. Elektroporaatiolla transfektoidut hASC 7/12 linjan solut. Kuvapaneelissa ylimpänä ovat kontrollisolut joille ei tehty transfektiota. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet kuvan keskimmaisilla riveillä ja alarivillä on pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet. Näytteiden solumäärät 24-kuoppalevyn kuoppaa kohti oli 50,000 tai 70,000 solua.

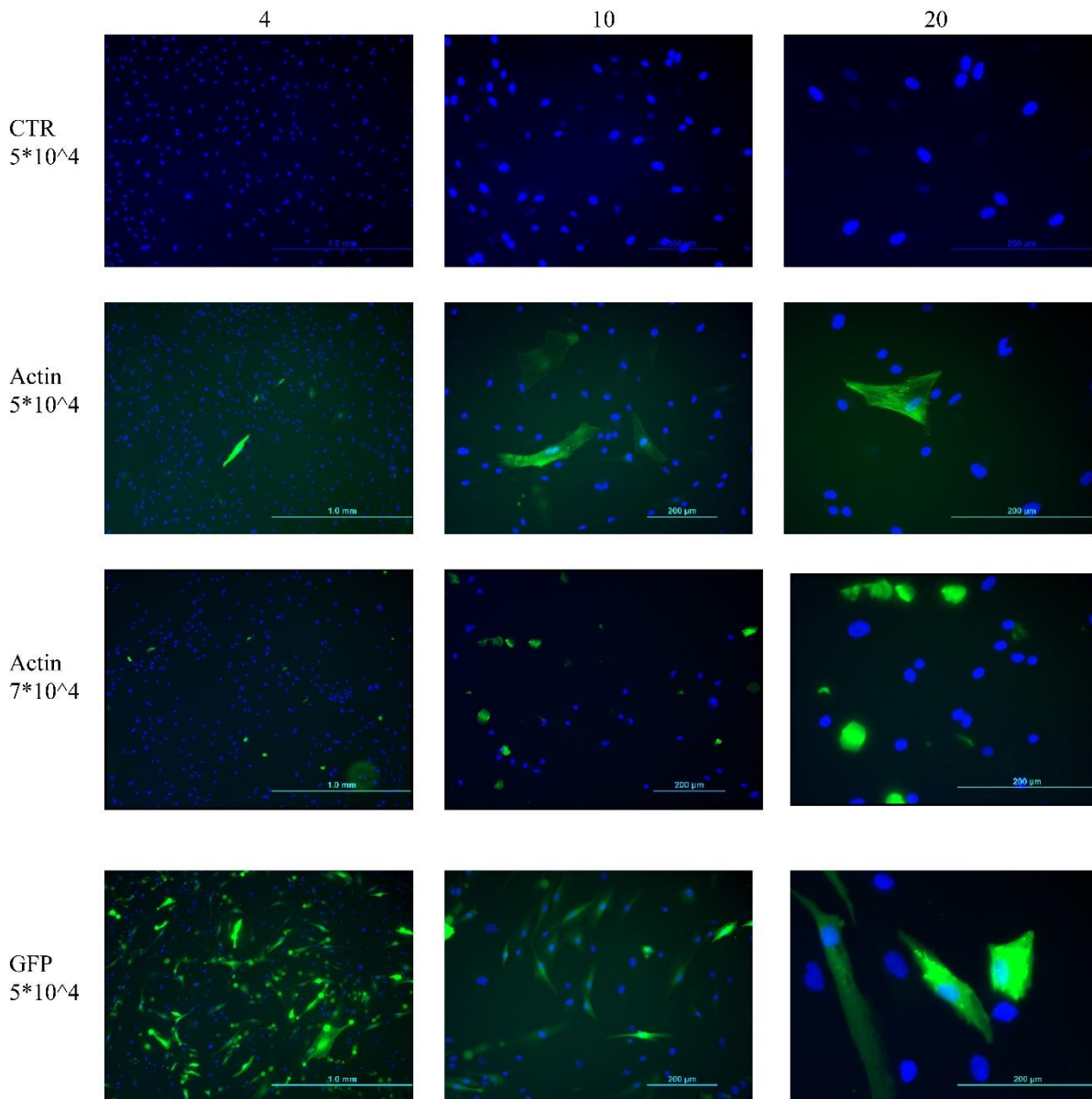
Kuvassa 28. esiintyy hASC 4/15 linjan solut. Transfektioituneiden solujen määrät Actin Chromobody näytteillä ovat vähentyneet paljon, kun verrataan kuvia 28. ja 29. pmaxGFP:llä transfektioituja näytteitä on edelleen havaittavissa paljon, vaikka fluoresoivien solujen värin intensiteetti oli vähentynyt.

hASC 4/15 Elektroporaatio



Kuva 28. hASC 4/15 linjan solut elävänä 24 tuntia elektroporaation jälkeen. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet kuvan ylä- ja keskivillillä ja alarivillä on pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet. Näytteiden solumäärät 24-kuoppalevyn kuoppaa kohti oli 50,000 tai 70,000 solua.

hASC 4/15 Elektroporaatio

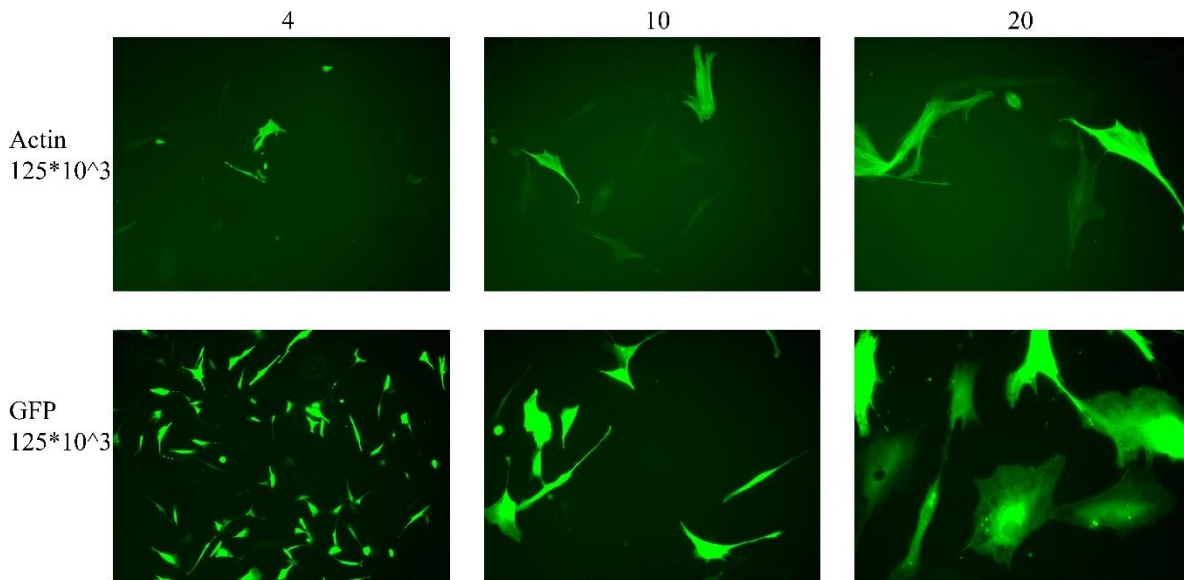


Kuva 29. Elektroporaatiolla transfektoidut hASC 4/15 linjan solut. Fiksattujen solujen tumat on värjätty DAPI:lla. Kuvapaneelissa ylimpänä ovat kontrollisolut joille ei tehty transfektiota. Actin Chromodyllä transfektoidut näytteet kuvan keskimmaisilla riveillä ja alarivillä on pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet. Näytteiden solumäärät 24-kuoppalevyn kuoppaa kohti oli 50,000 tai 70,000 solua.

Luuytimen kantasolunäytteet maljattiin 6-kuoppalevylle 125,000 solua kuoppaa kohti. Värjäytyneitä soluja on paljon, hBMSC 7/16 linjalla hiukan enemmän kuin hBMSC 6/16 linjalla. Lisäksi kuvassa 30. Actin Chromodyllä transfektoidut solut ovat melko himmeästi näkyvissä. Kuvassa 31. on näkyvissä hyvin vähän soluja sekä kontrolli- että transfektionäytteissä. Actin Chromobody näytteissä

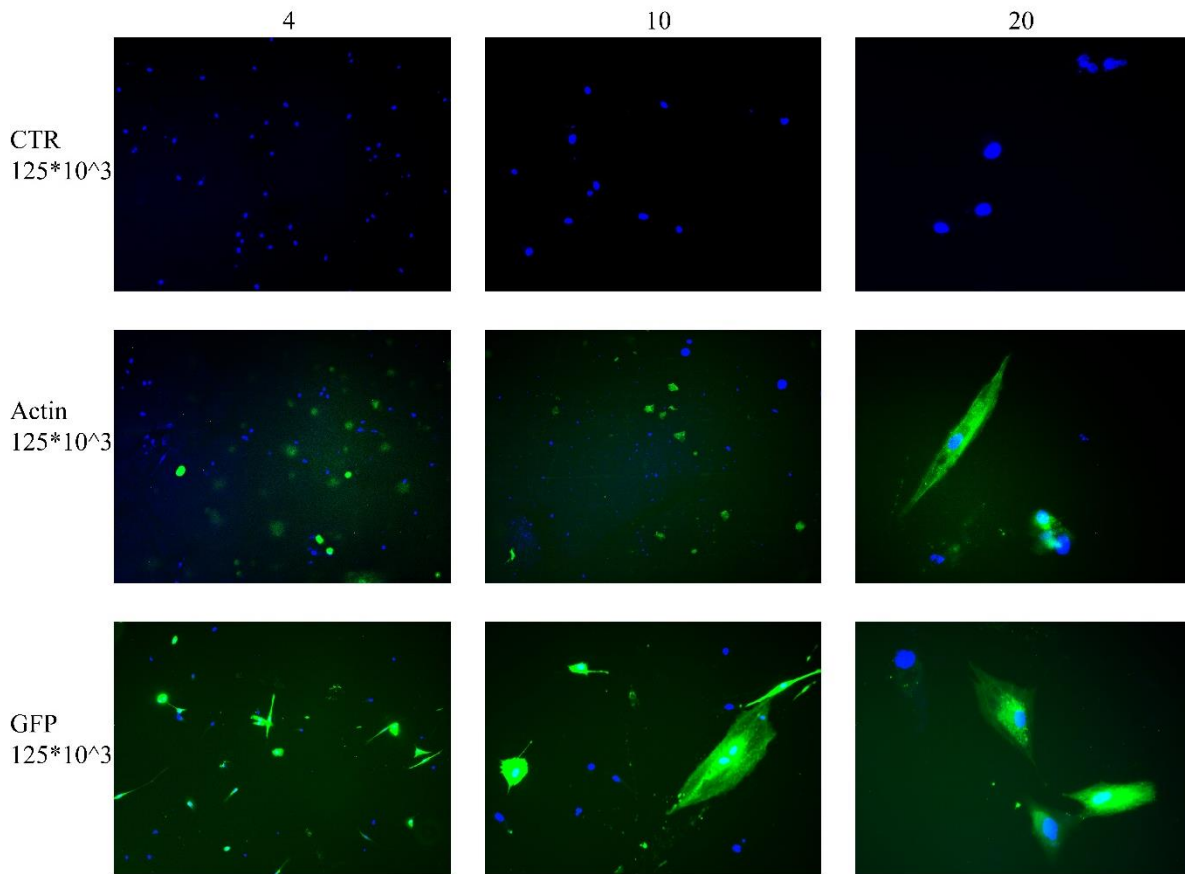
on värjäytyneitä soluja enää vähän jäljellä ja lisäksi ne harvat solut ovat hyvin pieniä ja pyöristyneitä. GFP-näytteissä vihreitä soluja havaitaan vielä kohtalaisesti, mutta niidenkin rakenteet ovat muuttuneita verrattuna kuvan 30. solujen muotoon.

hBMSC 6/16 Elektroporaatio



Kuva 30. hBMSC 6/16 linjan solut elävänä 24 tuntia elektroporaation jälkeen. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet kuvan ylärivillä ja pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet alarivillä. Näytteiden solumäärät 6-kuoppalevyllä oli 1250,000 solua/kuoppa.

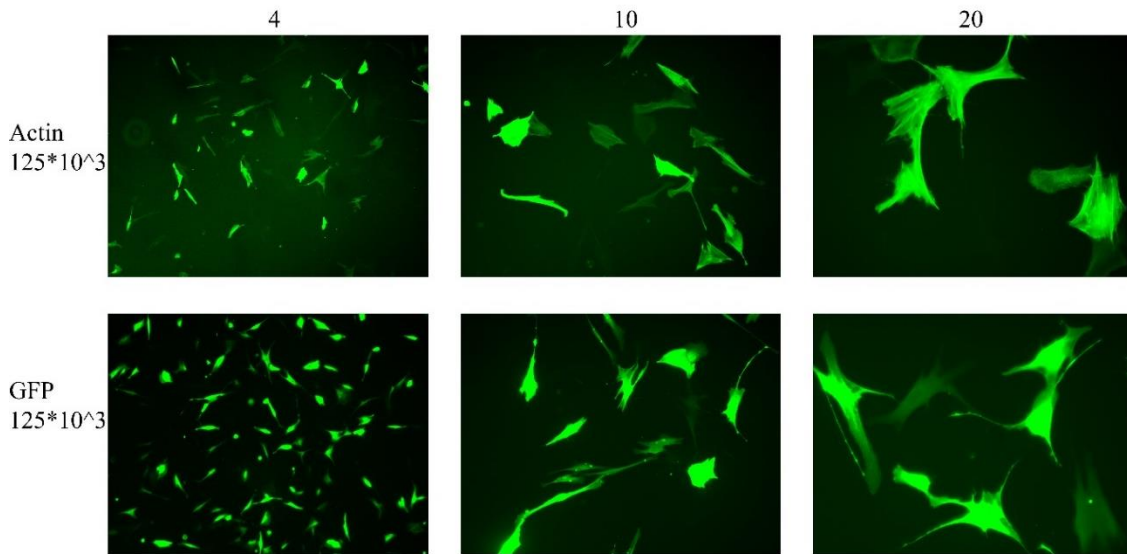
hBMS 6/16 Elektroporaatio



Kuva 31. Elektroporaation avulla transfektoidut fiksitut hBMS 6/16 linjan solut. Kuvassa on järjestyksessä ylhäältä alaspäin kontrollisolut, Actin Chromobodyllä transfektoidut solut ja pmaxGFP:llä transfektoidut solut. Näytteiden solumäärät 6-kuoppalevyllä oli 1250,000 solua/kuoppa.

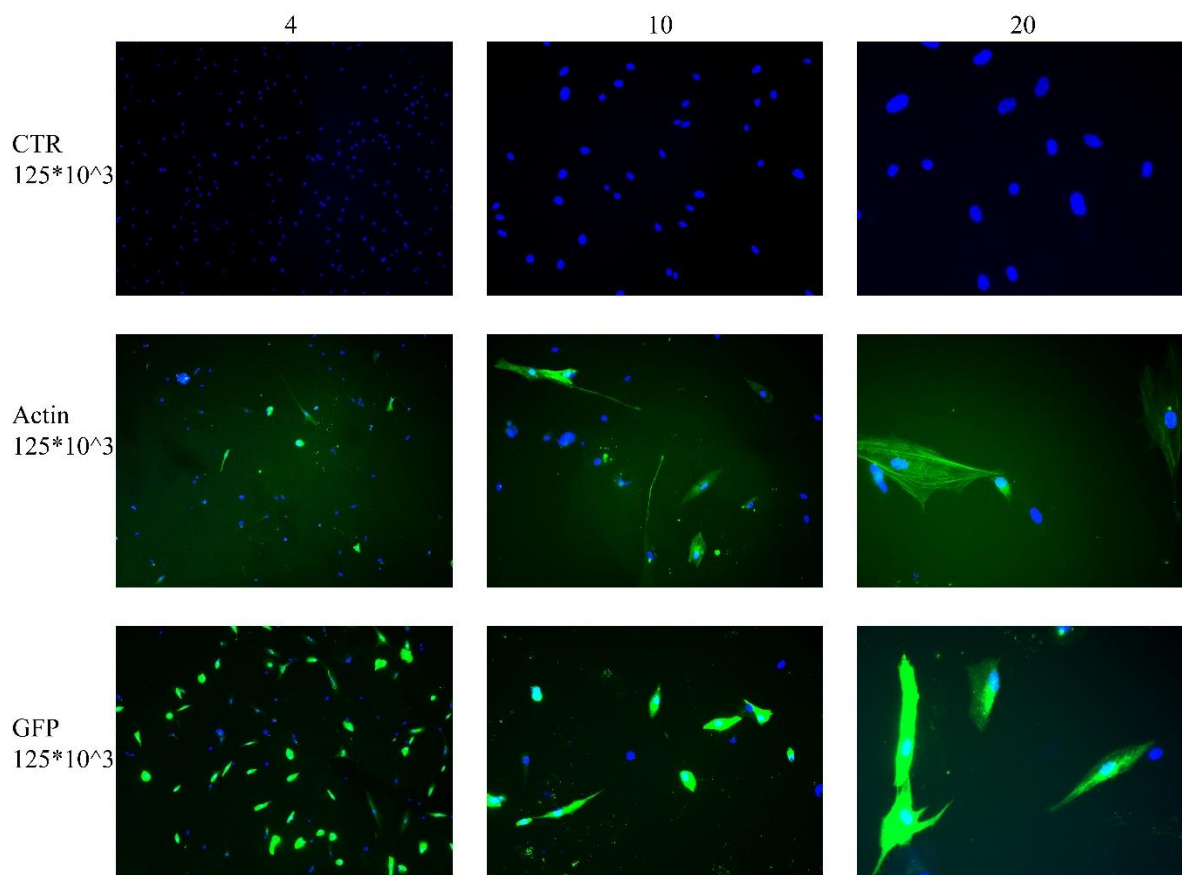
Actin Chromobodyllä transfektoituja luuytimen 7/16 linjan kantasoluja on reilusti ja niiden rakenne on hyvin havaittavissa. Näissäkin näytteissä on paljon eroa värin intensiteetissä. pmaxGFP-näytteissä on soluja näkyvissä todella runsaasti ja näkyvät solut ovat hyvin kirkkaita. hBMS 7/16 linjan solut 24 tuntia elektroporaation jälkeen ovat esillä kuvassa 32.

hBMSC 7/16 Elektroporaatio



Kuva 32. hBMSC 7/16 linjan solut elävänä 24 tuntia elektroporaation jälkeen. Actin Chromobodyllä transfektoidut näytteet kuvan ylärivillä ja pmaxGFP-plasmidilla tehdyt transfektionäytteet alarivillä. Näytteiden solumäärät 6-kuoppalevyllä oli 1250,000 solua/kuoppa. Kuvat on otettu viikon kuluttua transfektiosta.

Kuvassa 33. pmaxGFP plasmidilla transfektoidut solut ovat hyvin kirkkaita, mutta solujen määrä on vähentynyt kuvan 32. solumääriin nähden. Myös solujen muoto on pyöristynyt ja pienentynyt ajan kuluessa. Actin Chromodyllä transfektoituja soluja on vain enää muutama näkyvissä.



Kuva 33. Elektroporaation avulla transfektoidut hBMSC 6/16 linjan solut. Fiksattujen solujen sinisenä näkyvät tumat on värjätty DAPI:lla. Kuvassa on järjestyksessä ylhäältä alaspäin kontrollisolut, Actin-Chomobodyllä transfektoidut solut ja pmaxGFP:llä transfektoidut solut. Näytteiden solumäärät 6-kuoppalevyllä oli 1250,000 solua/kuoppa. Kuvat on otettu viikon kuluttua transfektiosta.

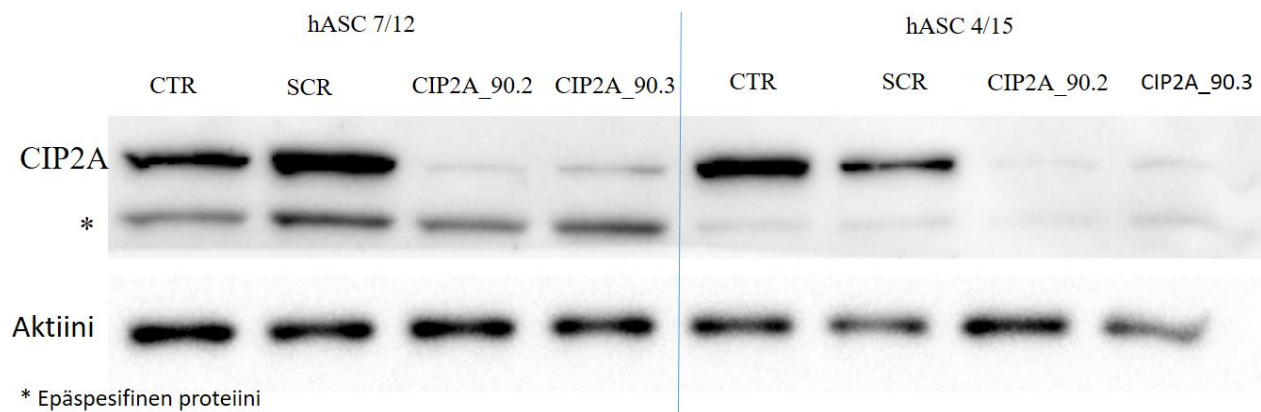
5.5 siRNA menetelmän tulosten esittäminen Western blottausten avulla

Western blottausta varten rasvan ja luuytimen kantasolunäytteet maljattiin 6-kuoppalevyille käyttäen solumäärää 40,000 solua/kuoppa. Maljauksesta seuraavana päivänä näytteet transfektoitiin Lipofectamine RNAiMAX reagenssin avulla. Kaksi vuorokautta transfektion jälkeen näytteet lyysattiin β -merkaptotoetanolilla ja 2x Laemmli-puskurilla, jossa oli mukana 20 % Natriumlauryylisulfaattia, raaputtamalla solut kuoppalevyn pohjalta ja kuumentamalla näytteet 95 °C viiden minuutin ajan. Näytteet varastoitiin -20 °C ja sulatettiin ennen western blottausta. Rasvan kantasolujen Western blot näytteet on kuvattu ChemiDoc Imaging system laitteella (Bio-Rad). Kuvassa 34. näkyy yläpuolella hASC solujen CIP2A proteiinin Western blot tulokset ja kuvan alaosassa on hASC näytteiden aktiininipitoisuus. Kuvan 34. vasemmassa reunassa on hASC linjan 7/12

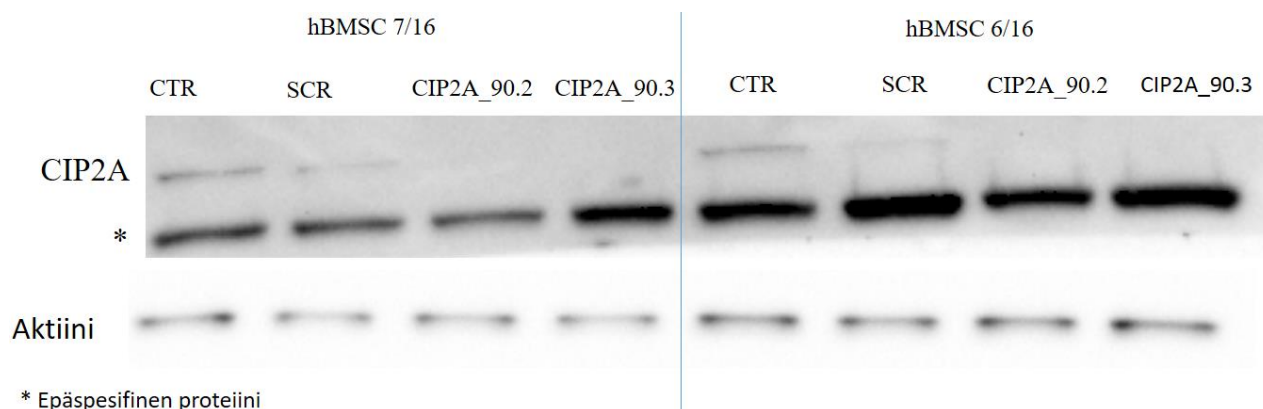
näytteet järjestyksessä kontrollinäyte, scrambled siRNA, CIP2A_90.2 ja CIP2A_90.3. Vastaavasti kuvan 34. oikeassa reunassa on linjan hASC 4/15 solujen näytteet. Tähdellä merkitty tumma juoste on spesifioitumattomasta proteiininäytteestä. Kontrollinäytteisiin verrattuna molemmilla solulinjoilla CIP2A proteiinin pitoisuudet ovat vähentyneet siRNA-transfektio käsittelyn jälkeen, mutta CIP2A proteiinin tuotantoa ei ole saatu kokonaan estettyä. Aktiinin pitoisuutta on seurattu, jotta nähdään, ettei transfektio aiheuta solujen muissa proteiineissa häiriötä. Kuvan perusteella voidaan nähdä, että aktiinipitoisuudet ovat kaikissa hASC näytteissä hyvin samanlaiset.

Image J Shortcut-ohjelman avulla on kuvasta 34. laskettu alentuneet CIP2A proteiinin tasot verrattuna scrambled näytteisiin ja tulokseksi on saatu, että proteiinien pitoisuudet alentuivat keskimäärin 92,86 %. Image J ohjelman avulla on laskettu, että linjan hASC 7/12 soluissa olisi 30 % enemmän aktiinia kuin hASC 4/15 linjan soluissa.

Vastaavasti kuvassa 35. näkyy luuytimen kantasoluilla kuvatut CIP2A proteiinin tulokset. Vasemmalla puolella kuvassa ovat hBMSC 7/16 solujen näytteet ja oikealla puolella ovat hBMSC 6/16 linjan näytteet. Kuvan keskimäinen paksu proteiinijuoste on peräisin tuntemattomasta epäspesifisestä proteiinista. Alareunassa on hBMSC näytteiden aktiinin tulokset. Transfektion avulla on saatu CIP2A proteiinin tuotanto estettyä kokonaan verrattuna kontrollinäytteisiin. hBMSC näytteillä on lähtökohtaisesti ollut vähemmän CIP2A proteiinia verrattuna hASC näytteisiin. Luuytimen kantasoluissa on myös selvästi vähemmän aktiinia (n. 25 %) kuin rasvan kantasoluissa.



Kuva 34. Chemidoc kuva Western blot analyysistä. Ylempänä kuvassa on CIP2A proteiinin tulokset. Keskimäinen proteiinijuoste on epäspesifioitu proteiini. Alarivillä on aktiinin pitoisuudet. Vasemmalla puolella on linjan hASC 7/12 näytteet ja oikealla puolella on linjan hASC 4/15 näytteet.



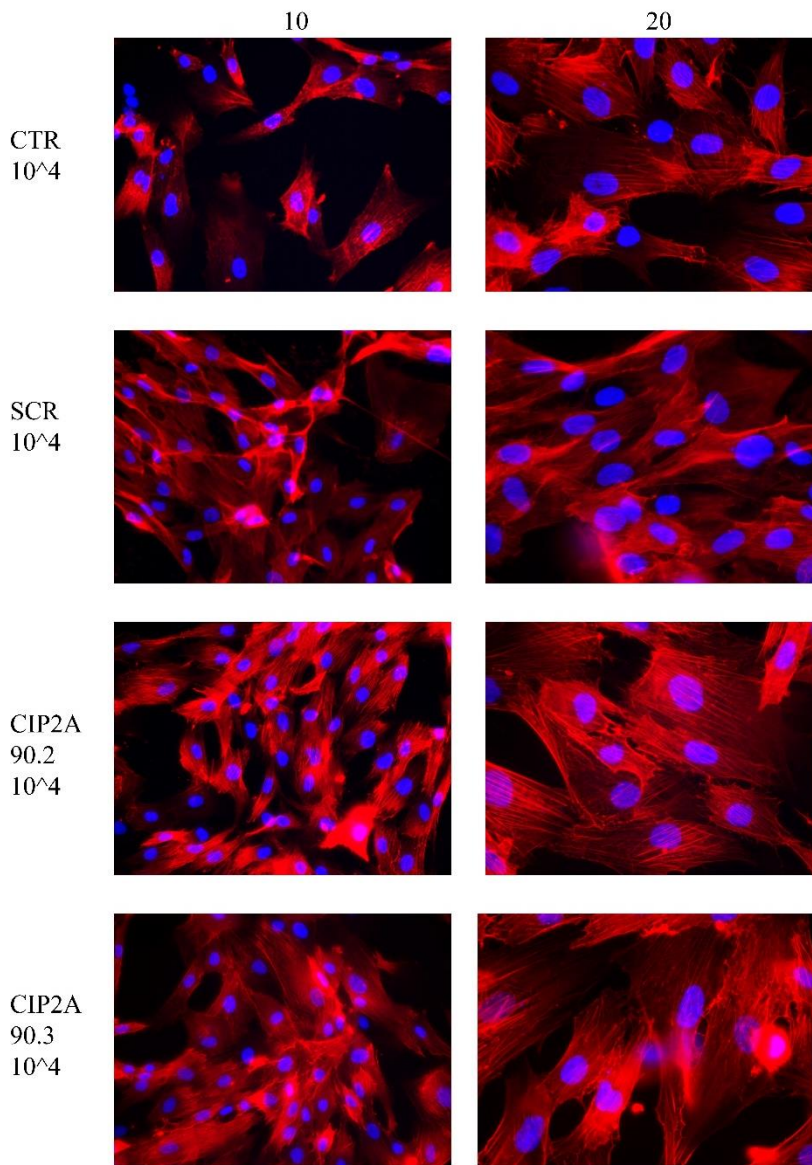
Kuva 35. Chemidoc kuva Western blot analyysistä. Ylempänä kuvassa on CIP2A proteiinin tulokset. Keskimmäinen proteiinijuoste on epäspesifioitu proteiini. Alarivillä on aktiinin pitoisuudet. Vasemmalla puolella on linjan hBMSC 7/16 näytteet ja oikealla puolen on linjan hBMSC 6/16 näytteet.

Image J Shortcut-ohjelman avulla on kuvasta 35. laskettu alentuneet CIP2A proteiinin tasot verrattuna scrambled näytteisiin ja tulokseksi on saatu, että proteiinien pitoisuudet alentuivat keskimäärin 99,94 %. Saamalla ohjelmalla on myös laskettu, että hBMSC 6/16 linjan soluissa on kolminkertainen määrä aktiinia verrattuna hBMSC 7/16 linjan soluihin.

5.6 siRNA-transfektio-ohjelman tulokset

Työssä testattiin myös siRNA-transfektion onnistumista käyttäen apuna Lipofectamine RNAiMAX reagenssia. Transfektio suoritettiin edellisenä päivänä maljatuille soluille, käytetyt solumäärät olivat 24-kuoppalevyllä 10,000 solua/kuoppa (hASC) ja 5,000 solua/kuoppa (hBMSC). Falloidiinivärjäystä varten tehdyt solunäytteet fiksattiin ja värjättiin kaksi vuorokautta transfektion jälkeen, lopuksi kantasolut kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla (kuvat 36-39). Solujen tumat on värjätty siniseksi DAPI:lla ja punaisella näkyy falloidiinilla värjätty aktiinitukiranka. siRNA:lla transfektoidut näytteet värjättiin, jotta voidaan tarkastella reagenssien vaikutusta solujen määrään transfektion jälkeen verrattuna kontrollinäytteisiin. Värjäyksen avulla voidaan myös tarkastella solujen mahdollisia muutoksia aktiinitukirangan tai tumien morfologiassa, jotka johtuvat transfektioista. Kuvat otettiin 10x ja 20x suurennoksilla ja yhdistettiin Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ohjelmalla. Kuvissa 36-39. järjestyksessä ylhäältä alaspäin ovat kontrollinäytteet, scrambled siRNA, CIP2A_90.2 ja CIP2A_90.3. Kuvissa 36. ja 37. on hASC näytteet ja kuvissa 38. ja 39. on hBMSC näytteet.

hASC 7/12 siRNA



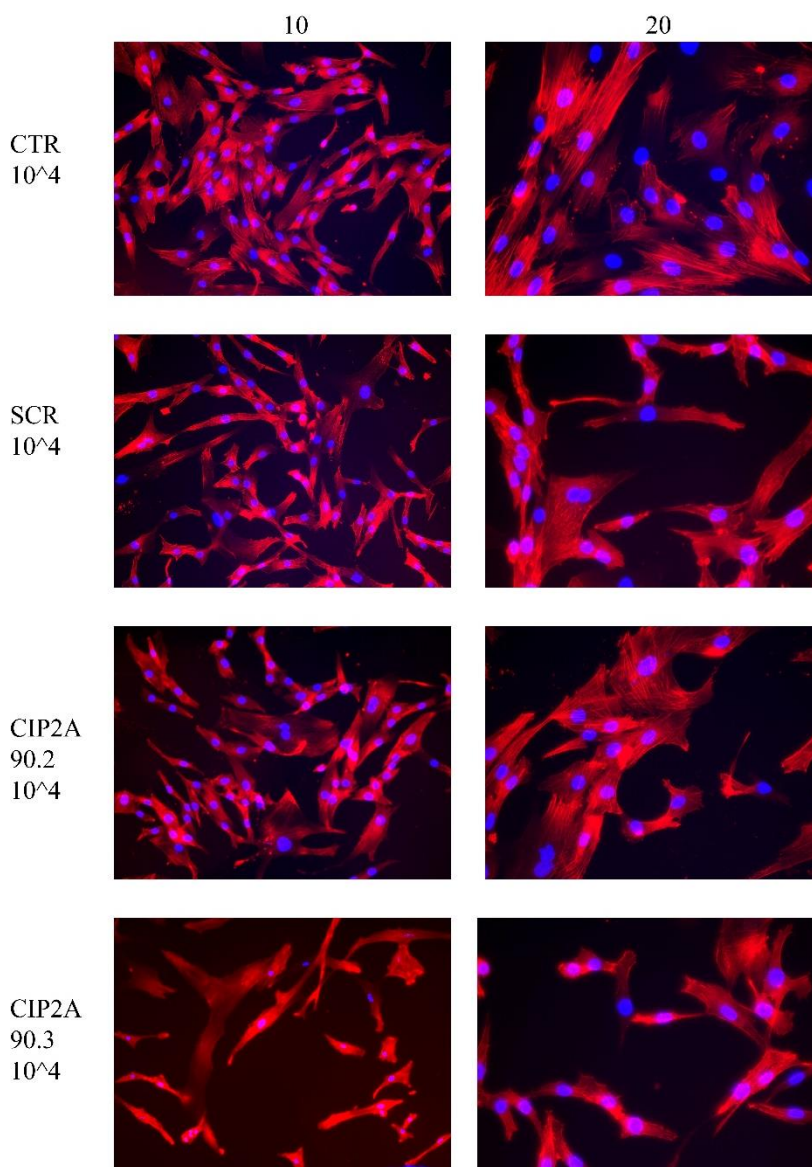
Kuva 36. hASC 7/12 linjan soluille tehty siRNA-transfektio. Solut on värjätty DAPI:lla (sininen) ja falloidiinilla (punainen). Näytteet on kuvattu 10x ja 20x suurennoksilla. Kaikkien näytteiden solumäärät olivat 40,000 solua/kuoppa.

siRNA transfektoitujen hASC 7/12 linjan solut värjäyksen jälkeen on nähtävillä kuvassa 36. Solujen värjäys on onnistunut hyvin tasaisesti ja solumäärät ovat riittävät. Tällä solulinjalla ei ole selkeästi havaittavissa muutoksia solun tukirangassa siRNA käsittelyn jäljiltä.

Kuvassa 37. esiintyy hASC 4/15 näytteet fiksattuina ja värjättyinä. Solumäärä on selvästi vähentynyt CIP2A_90.3 näytteen kohdalla, muissa näytteissä solumäärät ovat pysyneet hyvänä. Aktiinitukiranka

on hyvin värjäytynyt ja sen avulla voidaan nähdä pieniä eroja kontrollinäytteiden ja transfektoitujen näytteiden välillä. Transfektoidut ovat harvemmassa ja solujen muoto on hieman pienempi verrattuna kontrollinäytteisiin. Havaitaan, että CIP2A_90.3 transfektion jälkeen solujen tumat ovat hyvin pieniä 10x suurennosta tarkasteltaessa. Käytetyt transfektioreagenssit ovat saaneet aikaan solujen harventumisen, sillä mukana oleva SCR-transfektio ei aiheuta muutosta CIP2A:n proteiinin tuotannossa.

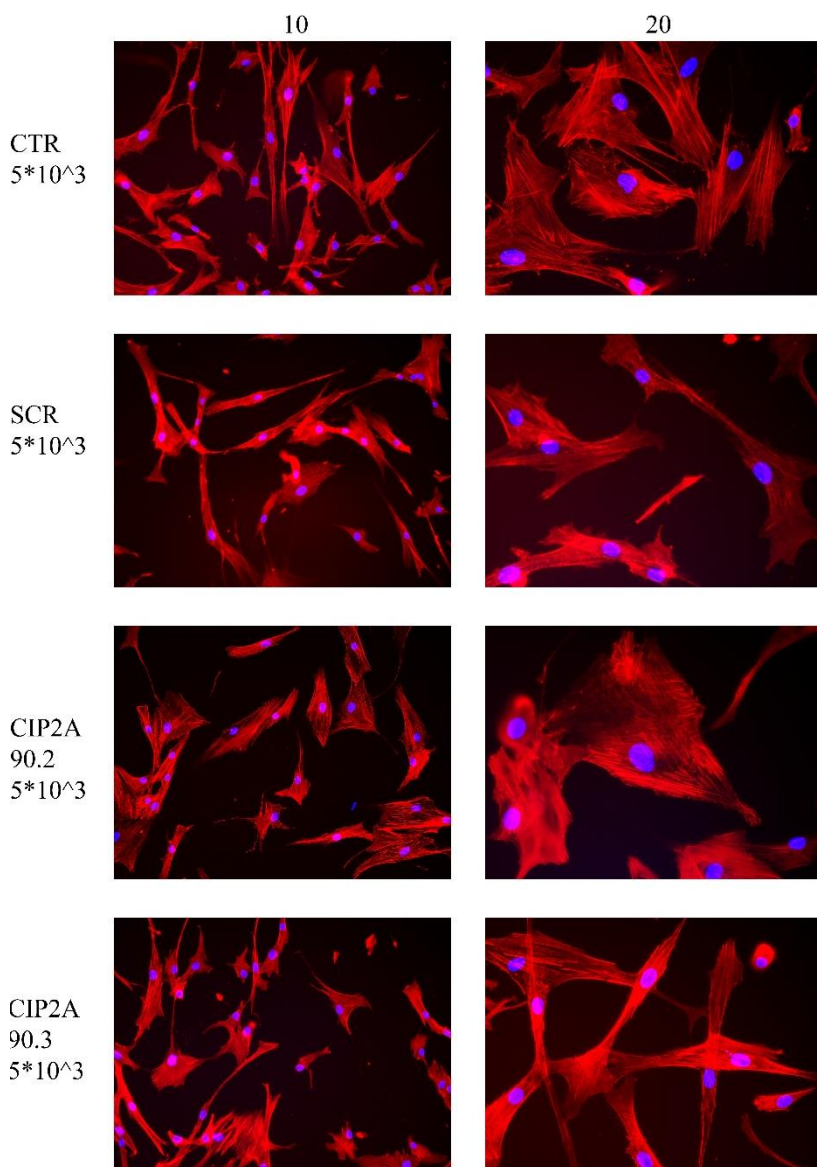
hASC 4/15 siRNA



Kuva 37. hASC 4/15 soluille tehty siRNA-transfektio. Solut on värjätty DAPI:lla (sininen) ja falloidiinilla (punainen). Näytteet on kuvattu suurennoksilla 10x ja 20x. Kaikkien näytteiden solumäärät olivat 40,000 solua/kuoppa.

siRNA-transfektion jälkeen hBMSC 6/16 linjan kontrollisolut (kuva 38.) ovat muodoltaan pitkänomaisia ja osa soluista on hyvin kapeita. SRC transfektoidut solut muistuttavat ulkomuodoltaan eniten kontrollisoluja. CIP2A_90.2 ja CIP2A_90.3 näytteiden kohdalla solujen värjätty aktiinitukiranka on osittain pyöreämpi kuin kontrollisoluilla. Transfektoitujen näytteiden solumäärät ovat hiukan pienempiä verrattuna kontrollisoluihin.

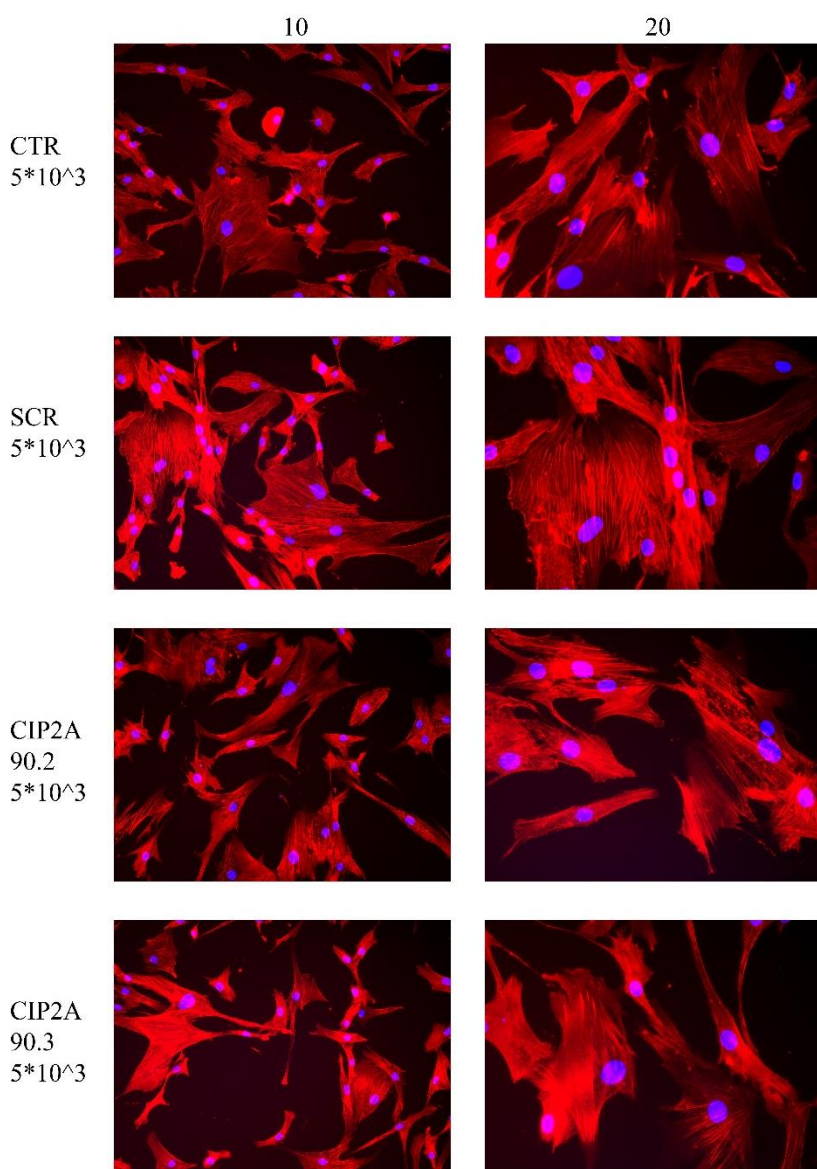
hBMSC 6/16 siRNA



Kuva 38. hBMSC 6/16 soluille tehty siRNA-transfektio. Solut on värjätty DAPI:lla ja falloidiinilla. Näytteet on kuvattu 10x ja 20x suurennoksilla. Kaikkien näytteiden solumäärät olivat 24-kuoppalevyllä 5,000 solua/kuoppa.

Kuvassa 39. luuytimen kantasoluilla 7/16 linjan soluissa puolestaan ei näy solumäärässä eroavaisuuksia kontrollisolujen ja käsiteltyjen solujen välillä. Myöskään solujen koossa ei havaita eroavaisuuksia näytteiden välillä. hBMSC 7/16 soluja on enemmän verrattuna hBMSC 6/16 linjan soluihin. Molemmille luuytimen kantasolulinjoille on tehty samanaikaisesti samat käsittelyt, joten eroavaisuudet solujen määrissä ja ulkomuodossa johtuvat linjakohtaisista eroista, sillä solunäytteet ovat peräisin eri luovuttajilta.

hBMSC 7/16 siRNA



Kuva 39. hBMSC 7/16 soluille tehty siRNA-transfektio. Solut on värjätty DAPI:lla (sininen) ja falloidiinilla (punainen). Näytteet on kuvattu 10x ja 20x suurennoksilla. Kaikkien näytteiden solumäärät olivat 5,000 solua/kuoppa.

6. Pohdinta

6.1 FuGENE reagenssin toimivuus transfektiossa

Rasvan kantasolujen FuGENE HD reagenssilla transfektoituja näytteitä on nähtävillä kuvissa 9. ja 10. Kontrollinäytteiden ja transfektoitujen näytteiden välillä ei solumäärässä ole juurikaan eroa, joten voidaan päätellä, ettei FuGENE reagenssi vaikuta solujen elinkykyyn. Transfektio on onnistunut, mutta tehokkuus on tässä menetelmässä erittäin pieni käytetyillä rasvan kantasoluilla. Molemmat solulinjat on testattu samoissa olosuhteissa, eikä linjojen välillä ole suuria eroja transfektion onnistumisessa. Molemmissa rinnakkaisissa näytteissä linjan hASC 4/15 fluoresoivia soluja oli havaittavissa vain yksittäisiä kappaleita. Vaikka tehokkuus FuGENE menetelmässä on pieni, transfektoituneet solut ovat hyvin kirkkaita ja solurakenne on ehjä. FuGENE reagenssilla tehtävää transfektiota on vielä optimoitava, esimerkiksi olisi mahdollista nostaa reagenssin tai plasmidin pitoisuutta. Toisaalta usein reagenssien pitoisuuden nostaminen voi aiheuttaa toksisia vaikutuksia solujen kasvuun. Tämän tutkimuksen perusteella FuGENE menetelmä ei vaikuta lupaavalta rasvan kantasoluilla jatkotutkimuksia varten.

hBMSC näytteet on kuvattu 48 tuntia transfektion jälkeen (Kuva 11.) ja uudestaan DAPI-värjäyksen jälkeen. Kuvassa 11. on havaittavissa, että transfektio on toiminut hBMSC 6/16 linjan soluilla huomattavasti paremmin kuin hBMSC 7/16 linjan soluilla. Molemmissa solulinjoissa oli enemmän transfektoituneita soluja kuin fiksauksen ja värjäyksen jälkeen. Kuvassa 12. ja 13. nähdään, että myös käytetyillä luuytimen kantasoluilla solumäärät ovat hyvin samanlaisia kontrollinäytteiden ja transfektoituneiden näytteiden välillä. Kummallakaan luuytimen kantasolulinjalla solumäärän lisääminen maljauksessa ei ole merkittävästi muuttanut transfektoituneiden solujen määrää. Luuytimen kantasoluilla molemmilla solulinjoilla pmaxGFP-plasmidi on toiminut transfektiossa paremmin kuin Actin Chromobody-plasmidi. Fluoresoivia soluja pmaxGFP-näytteissä on paljon ja väri on hyvin intensiivistä. Vaikka väri on kirkas, ei solujen aktiinirakennetta silti ole erityisen hyvin näkyvissä, sillä pmaxGFP- plasmidi voi tarttua solun muihinkin rakenteisiin eikä vain spesifisesti aktiiniin toisin kuin Actin Chromobody. Actin Chromobodyä käyttäessä harvat fluoresoivat solut ovat melko pienikokoisia ja osa näytteistä vain heikosti fluoresoivia. Fluoresoivia soluja oli molemmilla solulinjoilla hyvin vähän rinnakkaisissa näytteissä ja ne olivat levittäytyneet kuopan pohjalle hyvin satunnaisesti. Usein näytteissä solut olivat joko kerääntyneet hyvin tiiviisti kuoppalevyn keskelle tai sitten olivat ihan kuopan reunamilla, joten yksi mahdollinen virhelähde on voinut olla solujen maljauksessa tai kuoppalevyn pinnoitteessa. Fiksaamisen jälkeen soluja on mahdollisesti pesty

liiallisesti ja osa transfektoituneista soluista ovat irronneet maljalta ennen toista kuvaamista mikroskoopilla.

FuGENE reagenssin määrä suhteessa solujen määrään ja plasmidin määrään vaikuttaa transfektion onnistumiseen. Toisaalta liian alhainen pitoisuus ei anna toivottua tehokkuutta tuloksessa, mutta toisaalta liian suuri reagenssipitoisuus voi olla soluille toksinen. Vaikutusaika, jonka FuGENE reagenssi vaikuttaa DNA:n kanssa ennen yhdisteen lisäämistä solujen päälle on myös ratkaisevaa onnistumisen kannalta (Jacobsen ym. 2004). Tässä työssä molemmilla solutyypeillä reagenssien on annettu vaikuttaa 11 minuuttia, mikä voi olla yksi tekijä, miksi FuGENE:lla ei ole saatu toivottuja tuloksia transfektiotehokkuudessa. Valmistaja suosittelee käytettävän 15 minuutin inkubaatioaikaa ennen FuGENE/ DNA sekoituksen lisäämistä solujen päälle (Promega). Jacobsen ym. (2004) mainitsevat työssään, että myös käytettyjen solujen jakaantumiskerrat ovat voineet vaikuttaa transfektion onnistumiseen. FuGENE reagenssin sanotaan toimivan parhaiten, kun solunäytteiden jakaantumiskertojen määrä on mahdollisimman pieni. Tässä työssä käytettyjen hASC näytteiden siirrostusluku oli P4 ja luuytimen kantasoluilla siirrostusluku oli P6.

Useissa tutkimuksissa on käytetty FuGENE reagenssia yhtenä verrokkina, kun on testattu kemiallisia reagensseja transfektiota varten (Antczak ym. 2014, Jacobsen ym. 2004, Jacobsen ym. 2009 ja Liu ym. 2009). Kuitenkin kaikissa näissä tutkimuksissa käytössä on ollut eri solutyyppejä ja vähän erilaisia tutkimusolosuhteita, joten vaikka useammat ovatkin saaneet vakuuttavia tuloksia FuGENE reagenssin suhteen, ei voida yleistää sen sopivan kaikille solutyypeille. FuGENE reagenssia myyvä kaupallinen yritys valmistaa useita erilaisia versioita samasta reagenssista, hiukan koostumusta vaihdellen. Osassa tutkimuksissa on myös käytetty esimerkiksi FuGENE 6 reagenssia, jolloin sen tuloksia ei voida myöskään suoraan soveltaa tässä työssä käytettyyn FuGENE HD reagenssiin. Eräässä tutkimuksessa (Antczak ym. 2014) oli testattu myös kontrollinäytteille FuGENE reagenssia ilman plasmidia, sillä tavoin voidaan myös samanaikaisesti havaita aiheuttaako jo pelkkä reagenssi haittaa soluille. Toisaalta silloin täytyisi vielä olla mukana erillinen kontrollinäyte ilman reagenssia. Erityisesti Antczak ym. (2014) korostivat tutkimuksessaan, että joka solutyypille ja -linjalle täytyy jossain määrin optimoida erikseen sopiva menetelmä, solujen määrä, käytettävä reagenssi, kemikaalien pitoisuus sekä transfektioaika.

Vertailtaessa kemiallisia transfektion reagensseja olivat tutkijat huomanneet, ettei FuGENE ollut erityisen tehokas eikä juurikaan sovellu myöskään immunogeeniseen tutkimukseen. Vaikka tutkijat eivät suoraan vakuuttuneet FuGENE reagenssista, mainitsivat he kuitenkin, että menetelmä voi toimia joillain muilla geeneillä ja soluilla paremmin, mutta ei heidän tutkimillaan soluilla, jotka olivat MCF7 (ATCC HTB-22) (Jacobsen ym. 2009). Eräässä tutkimuksessa (Liu ym. 2009) oli

transfektoituja soluja kuvattu fluoresenssimikroskoopilla ja lisäksi näytteet oli myös kuvattu tavallisella mikroskoopilla samasta kohtaa. Tällä menetelmällä pystyttiin havaitsemaan fluoresoivien solujen osuus kaikista solunäytteistä. Tällä tavoin voidaan kuvata eläviä soluja ja niitä voidaan tarkastella pidemmälläkin ajanjaksolla helpommin.

FuGENE on kaupallisesti saatava reagenssi, jonka kerrotaan vaikuttavan pitkäaikaisesti soluissa, mutta tässä työssä ei ollut mahdollista testata pysyvä vaikutus soluissa pidempään. Heikon tehokkuutensa ja kalliin hinnan vuoksi FuGENE ei ole vakuuttava menetelmä luuytimen kantasolujen transfektion. Actin Chromobody voi olla soluille liian iso molekyyli transfektoitavaksi, sillä pmaxGFP antaa melko hyviä tuloksia myös käytettäessä FuGENE reagenssiä. Lisäksi käytettävän DNA:n pitäisi olla erittäin puhdasta, jotta transfektioteho ei laskisi (Promega). FuGENE reagenssi ei aiheuttanut eroa solujen määrässä, mutta on luultavasti vaikuttanut solujen elinkykyyn, sillä transfektoituneet solut ovat hyvin pienikokoisia. Valmistajan kotisivuilla oli lista solutyypeistä, joilla FuGENE HD on tuottanut hyviä transfektiotuloksia, mutta listassa ei ollut mukana kumpaakaan tässä työssä käytettyä solutyyppiä.

6.2 Lipofectamine reagenssin toimivuus transfektiossa

Lipofectaminella transfektoituja eläviä rasvan kantasoluja on nähtävillä kuvassa 14. Näytteet on kuvattu 48 tuntia transfektion jälkeen ja havaitaan, että transfektio on hyvin onnistunut molemmilla rasvan kantasolulinjoilla. Fluoresoivia soluja on runsaasti näkyvissä, vaikkakin fluoresoivien solujen koko ja värin kirkkaus vaihtelevat jonkin verran. Kuvista 15. ja 16. huomataan, että transfektio on onnistunut hyvin hASC 7/12 linjan soluilla molemmilla käytetyillä solumäärillä ja Lipofectamine/DNA suhteilla. Suurennoksilla 10x ja 20x nähdään, että linjan 7/12 solujen aktiinitukiranka on hyvin levittäytynyt ja ehjä. Tarkasteltaessa kuvia 14-17. ei voida myöskään sanoa, että rasvan kantasoluilla olisi suuria linjakohtaisia eroja 4/15 ja 7/12 solujen välillä. Kuvista 15-17. voidaan nähdä että transfektio on soluille jonkin verran toksista sillä kaikilla suurennoksilla voidaan havaita eroja tumien määrissä verrattaessa kontrollinäytteisiin. Toisaalta voidaan myös sanoa, että vaikka solumäärät ovatkin transfektiossa pienentyneet niin soluja on edelleen runsaasti. Tumien muodosta ei näillä suurennoksilla vielä havaita eroavaisuuksia transfektoituneiden ja kontrollinäytteiden välillä. Kuvassa 17 havaitaan 4x suurennoksella Lipofectamine/DNA suhteen ollessa 1:3, että transfektio on onnistunut, mutta hyvin paikallisesti. Tässä testissä näyttäisi, että kontrollisoluja on maljalle kiinnittynyt melko harvakseltaan, mikä havaitaan verrattaessa transfektoituneiden ja kontrollinäytteiden tumien määrää keskenään.

Rasvan kantasoluilla transfektio on onnistunut hyvin ja tasaisesti rinnakkaisten näytteiden välillä. Fluoresoivia soluja näkyi melko hyvin myös fiksauksen jälkeen, mutta transfektoituneita soluja oli silti huomattavasti enemmän kuvissa, jotka oli otettu 48 tuntia transfektion jälkeen. Lipofectamine menetelmällä on selkeästi edellytyksiä myös jatkotutkimuksia varten, mutta fiksaamisolosuhteita on vielä mahdollista optimoida.

Kuvissa 18.-20. on Lipofectaminella transfektoidut luuytimen kantasolut. Ennen fiksaamista otetuissa kuvissa fluoresoivia soluja on runsaasti näkyvillä, etenkin 4x suurennoksella. Isommilla suurennoksilla nähdään, että solujen aktiinitukiranka on hyvin huonosti näkyvissä ja solut ovat kooltaan hyvin pieniä. Ensimmäisissä Lipofectaminekuvissa transfektoituneiden solujen määrä on huomattavasti suurempi kuin fiksaamisen jälkeen otetuissa kuvissa. Kuvien 19. ja 20. fluoresoivista soluista nähdään, että plasmidi DNA on läpäissyt solukalvon toivotulla tavalla, mutta menetelmä on myös ollut soluille osittain haitallinen. Solujen muodosta nähdään, että solujen aktiinitukiranka on vaurioitunut Lipofectamine käsittelystä. Solut ovat rakenteeltaan pienikokoisia ja ne ovat kuoppalevyllä harvassa. Kaikilla suurennoksilla nähdään, että kuvissa on paljon pieniä vihreitä pisteitä, jotka voivat olla kokonsa puolesta hajonneiden solujen aktiinitukirangan osia. Luuytimen soluissa voidaan havaita myös jonkin verran linjakohtaisia eroja. Lipofectamine transfektio on onnistunut hBMSC 7/16 linjan soluilla huomattavasti paremmin kuin hBMSC 6/16 soluilla. Kuvasta 19. nähdään, että solukuolemia on ollut paljon verrattaessa transfektoituneita soluja ja kontrollinäytteitä. Vaikka hBMSC 6/16 linjan soluilla transfektoituneissa näytteissä lähes kaikki eloon jääneet solut ovat fluoresoivia, jäljelle jääneille soluille tuskin voitaisiin tehdä lisätutkimuksia, koska solukato on ollut aivan liian suurta.

Transfektoituneet luuytimen kantasolut eivät fluoresoi yhtä intensiivisesti kuin esimerkiksi rasvan kantasolut. Muista tämän työn testauksista poiketen, pmaxGFP plasmidin transfektio on ilmeisesti onnistunut huonommin kuin Actin Chromobodyllä. Pientä eroa voidaan kuitenkin havaita vihreän värin intensiivisyydessä, sillä pmaxGFP:llä transfektoidut solut ovat hiukan kirkkaampia. Transfektio on onnistunut luuytimen kantasoluilla heikosti ja optimoimista tässä menetelmässä on vielä paljon. Lipofectamiinin ja DNA:n määrää säätelemällä voidaan vaikuttaa solujen eloonjäämiseen. Lisäksi olosuhteita voidaan säädellä maljauksessa käytettävällä solumäärällä ja inkubaatioajalla ennen kuvaamista. Tässä työssä testien ja näytteiden lukumäärä on ollut rajallista, mutta johtopäätöksenä voidaan sanoa, menetelmän soveltuvan melko hyvin rasvan kantasoluille, mutta ei yhtä hyvin luuytimen kantasoluille. Toisaalta tämä tulos vahvistaa sitä, että solutyypit ovat keskenään erilaisia. Vaikka useissa tutkimuksissa (Chernousova & Eppl 2017, Rao ym. 2015) on käytetty Lipofectaminea kemialliseen transfektioon menestyksekkäästi, ei tuloksia voida täysin

verrata keskenään eri solutyypin takia. Fluoresoiva väri myös haalistuu itsessään ajan kuluessa ja valolle altistuessa, joten se voi selittää eroja kuvissa, jotka on otettu ennen fiksaamista ja sen jälkeen.

6.3 Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmän toimivuus transfektiossa

Transfektio kalsiumfosfaattisaostuksella on onnistunut rasvan kantasoluilla, mikä nähdään kuvassa 21. Tarkempi tarkastelu näyttää, että fluoresoivia soluja on 4x suurennoksella tarkasteltuna melko paljon. Toisaalta 20x suurennoksella havaitaan värjäytyneiden aktiinisäikeiden hajonneen transfektion aikana, sama ilmiö havaitaan kuvissa 22. ja 23. Tuloksissa on myös nähtävissä selkeä ero hASC 7/12 ja 4/15 linjojen välillä, edellä mainitut solut ovat selvästi paremmin transfektoituneet. Molempien rasvan kantasolunäytteiden fluoresoivat solut ovat vähentyneet huomattavasti verrattuna kuviin 22. ja 23., jotka on otettu vasta fiksaamisen jälkeen. Fiksaus on tehty ensimmäisen kuvauksen jälkeen samana päivänä ja se vaatii vielä selvästi olosuhteiden optimointia. Transfektio käyttäen Actin Chromobodyä ja pmaxGFP- plasmidia mahdollistaa elävien solujen tarkastelun, joten solujen fiksaaminen ei ole välttämätöntä. hASC 7/12 linjan soluilla kalsiumfosfaattisaostus on tuottanut jonkin verran transfektoituneita soluja, mutta hASC 4/15 soluilla menetelmä ei ole toiminut lähes ollenkaan, vaikka molempien solulinjojen käsittelyt ovat olleet samanlaiset. Rasvan kantasoluilla näytteiden välillä ei ollut eroa onnistumisessa, riippumatta siitä oliko näytteitä maljattu 10,000 tai 20,000 solua/kuoppa, joten työhön on otettu näkyville vain edustavimmat kuvat.

Luuytimen kantasoluilla menetelmää on testattu kahdella eri DNA-plasmidilla. pmaxGFP-plasmidilla testattuna värjäytyneet solut ovat hiukan intensiivisempiä kuin Actin Chromobodyllä. Määrällisesti transfektoiduissa soluissa ei kuitenkaan ole juurikaan eroja eri plasmidien välillä. Transfektioituja luuytimen kantasoluja on huomattavasti vähemmän verrattuna kontrollinäytteisiin. Solujen tumat ovat myös hyvin himmeästi värjäytyneitä, joten tarkkaa määrää on haastavaa arvioida. Kummallakaan hBMSC linjoilla $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus menetelmä ei ole antanut erityisen lupaavia tuloksia. Transfektioituneita soluja on todella harvassa ja ne ovat hyvin pieniä varsinkin Actin Chromobodyllä testatuissa näytteissä. pmaxGFP:llä transfektoidut solut ovat jälleen kirkkaampia, mutta aktiinitukiranka on niissäkin osittain rikkoontunut eikä solun rakenne ole selkeä. hBMSC näytteistä 7/16 linjan solut ovat hiukan paremmin transfektoituneet verrattuna toiseen käytettyyn solulinjaan. Fluoresoivien solujen määrissä ei ollut eroja riippumatta kumpaa solumäärää työssä on käytetty.

Kalsiumfosfaattisaostuksen avulla transfektioitujen rasvan ja luuytimen kantasolujen lukumäärä oli huomattavasti vähemmän kuin kontrollinäytteissä olevien solujen lukumäärä. Rasvan kantasolujen

lukumäärä väheni enemmän verrattuna luuytimen kantasoluihin. Tästä voidaan päätellä, että menetelmä on ollut soluille haitallinen ja häirinnyt niiden elinkelpoisuutta. Sama ilmiö on havaittavissa molemmilla solutyypeillä kaikissa näytteissä, joten se ei ole vain satunnainen virhe työn suorituksessa. Menetelmän olosuhteita on vielä mahdollista optimoida, jotta solujen elinolosuhteet eivät häiriintyisi. Virhelähteinä epäonnistumisessa on myös voinut olla DAPI-värjäyksen epäonnistuminen tai huono tarkennus mikroskoopilla kuvatessa.

Useissa kirjallisissa lähteissä mainittiin, että kun lisätään HBS puskuriliuos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{DNA}$:n kanssa, pitäisi muodostua valkoista sakkaa putken pohjalle. Tässä työssä $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus menetelmää testattaessa kummallakaan solutyypillä ei missään vaiheessa muodostunut sakkaa putken pohjaan, vaikka putkia ravisteltiin lisäyksen aikana. Muodostunut saostuma voi myös olla hyvinkin pysyvä, jolloin se ei pääse aiheuttamaan haluttua vastetta. Toisaalta, jos saostumaa ei muodostu, on menetelmän tehokkuus vaihtelevaa, koska DNA ei välttämättä ole kovin vakaa soluväliaine ympäristössä ja silloin DNA ei välttämättä ehdi kulkeutua solulle asti (Guo ym. 2017, Jordan ym. 2004, Kingston ym. 2003). Sanotaan myös, että glyserolishokki transfektion jälkeen parantaisi menetelmän tehokkuutta, sitä ei kuitenkaan tämän työn aikana kokeiltu. Glyserolinshokin jättäminen työstä pois on voinut vaikuttaa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus heikkoihin tuloksiin. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus on paljon käytetty transfektio-menetelmä, mutta tässä työssä se ei vakuuttanut tehokkuudeltaan. Kalsiumfosfaattisaostusmenetelmä on hyvin edullinen halpojen reagenssien vuoksi, mutta sen on myös huomattu olevan melko tehoton varsinkin jo pitkälle erikoistuneiden solujen transfektioon (Guo ym. 2017). Siirrettävän DNA:n määrä on optimoitava tarkkaan, sillä suurempi DNA mahdollistaa paremman transfektion, mutta liian suuressa määrin vieras DNA vaikuttaa negatiivisesti solun elinkykyyn (Batard ym. 2001). Toinen oleellinen tekijä on pH:n säätö, joka on hyvin tarkkaa ja esimerkiksi CaCl_2 :n molaarisuutta ei erikseen tarkistettu. Puskuriliuoksen kyky ei välttämättä ole riittävä estämään happamoitumista ja plasmidi hajoaa ennenaikaisesti solun sisällä. (Batard ym. 2001, Kingston ym. 2003). Mediumin komponentit vaikuttavat saostuman muodostumiseen ja pysyvyyteen. Kalsium on mahdollista korvata useilla varautuneilla ja saostuvilla ioneilla, kuten esimerkiksi Mg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ja fosfaattiryhmä voidaan korvata, vaikka karbonaatti-ryhmällä. Ionien korvaaminen ei muuta menetelmän periaatetta. (Jordan ym. 2004).

Chernousova & Eppl (2017) olivat tutkimuksessaan vertailleet Lipofectamine ja kalsiumfosfaattisaostus menetelmiä ja olivat huomanneet Lipofectaminen olevan huomattavasti tehokkaampi transfektiossa kuin $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus. Lipofectamine ja $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -saostus menetelmissä molemmissa DNA kulkeutuu samanlaista reittiä pitkin soluun, mutta Lipofectamine pystyy paremmin suojaamaan DNA:ta solunsisäiseltä hajoamiselta. Lipofectamine voi olla soluille

vielä toksisempaa kuin kationiset partikkelit, mutta se myös transfektoi soluja tehokkaammin ja nopeammin. Toisaalta kalsiumfosfaattipartikkelit soveltuvat paremmin transfektioon, jossa on tarkoitus siirtää useampia biomolekyylejä soluun. (Chernousova & Epple 2017). Useissa tutkimuksissa on todettu, että transfektion onnistumiseen vaikuttaa liuoksen pH, [DNA], Ca^{2+} ja PO_4^{3-} ionien määrät sekä reagenssien lämpötila. Kalsiumfosfaattisaostusta pidetään vahvana ja hyvänä menetelmänä, mutta yhdessäkin kyseisistä tutkimuksista ei ollut käytetty kantasoluja, joten tulokset eivät ole täysin verrattavissa keskenään. Kalsiumfosfaattisaostusta on pitkään käytetty solujen transfektiossa, mutta tehokasta transfektiota varten menetelmä vaatii edelleen kehitettävää, vaikka sitä on paljon yritetty optimoida. Keskeisiä haasteita menetelmässä on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ aggregaattien muodostuminen sekä niiden alhainen stabiilisuus solu ympäristössä. (Chernousova & Epple 2017, Guo ym. 2017, Jordan ym. 2004, Khan ym. 2016, Kingston ym. 2003). Eräässä tutkimuksessa (Kingston ym. 2003) ehdotettiin, että transfektion jälkeen soluja olisi hyvä pitää ensimmäinen yö 3% hiilidioksidipitoisuudessa, tässä työssä käytettävissä inkubaattoreissa $[\text{CO}_2]$ oli 5%. Muutoksen pitäisi säilyttää liuoksen pH paremmin oikealla tasolla (noin pH 7.6). Tässä työssä liuoksen pH:ta ei mitattu, mutta ei myöskään havaittu mediumin värissä mitään muutoksia.

6.4 Elektroporaation toimivuus transfektiossa

Elektroporaatiolla transfektoituja näytteitä tutkittiin kuuden päivän ajan transfektion jälkeen. Näytteet kuvattiin 1., 3. ja 6. päivänä ja tähän työhön on otettu mukaan kuvat ensimmäisestä kuvauskerrasta ja viimeisestä, joka suoritettiin DAPI-värjäyksen jälkeen. Rasvan kantasoluilla työssä käytettiin Actin Chromobodylle kahta eri solumäärää (50,000 ja 70,000 solua/kuoppa). hASC 7/12 linjan kohdalla ei ollut eroavaisuuksia transfektoituneiden solujen määrässä riippumatta lähtökohtaisesta solumäärästä. Sen sijaan hASC 4/15 linjan soluilla oli 70,000 solumäärän näytteissä enemmän fluoresoivia soluja kuin pienemmällä solumäärällä. Transfektoituneita soluja oli kuitenkin molemmilla rasvan kantasolulinjoilla ja solumäärillä huomattavan paljon. Lisäksi solut olivat värjäytyneet pääosin hyvin kirkkaasti ja aktiinisäikeistä muodostunut solun tukiranka oli ehjä. Rasvan kantasolunäytteitä testattiin myös pmaxGFP-plasmidilla ja se on työssä onnistunut vielä paremmin kuin Actin Chromobody. Fluoresoivia soluja oli todella paljon ja väri erottui selkeästi. Vaikka transfektoituneita soluja oli ensimmäisen kuvauksen aikana hyvin runsaasti, sekä transfektoituneiden solujen määrä, että värin intensiivisyys vähenivät tutkittavan ajanjakson aikana huomattavasti. Erot voidaan nähdä, kun verrataan samojen näytteiden kuvia 24 tuntia transfektioista ja kuvia DAPI-värjäyksen jälkeen (7 päivää transfektion jälkeen). Kuuden kuvauspäivän aikana huomattiin, että pmaxGFP-plasmidi säilytti fluoresoivan värin soluissa paremmin kuin Actin Chromobody. Solujen rakenteissa nähtiin

myös enemmän muutoksia pmaxGFP:llä verrattaessa ensimmäisiä ja viimeisiä kuvia keskenään. Ajan kuluessa elektroporaationäytteiden solujen fluoresoivasti värjäätynyt aktiinitukiranka vetäytyi hiukan kasaan ja sai solut näyttämään pyöreiltä. Solujen pyöristyminen viittaa niiden elinkyvyn huonontumiseen.

Luuytimen kantasoluilla molempia plasmideja testattiin vain yhdellä solumäärällä: 125,000 solua/kuoppa. Jälleen pmaxGFP-plasmidi toimi testauksessa molemmilla solulinjoilla paremmin kuin Actin Chromobody. hBMSC 6/16 linjan kohdalla Actin Chromobody toimi hyvin heikosti jo 24 tuntia transfektion jälkeen suoritettussa kuvauksessa, mutta hBMSC 7/16 linjalla se puolestaan toimi hyvin. Kuten rasvan kantasolunäytteillä myös luuytimen kantasolunäytteillä testauksen edetessä transfektoituneiden solujen määrä ja fluoresoivan värin kirkkaus vähentyi merkittävästi verrattuna ensimmäisiin elektroporaatiokuviiin. Solujen rakenteessa oli myös havaittavissa niiden pyöristymistä kuten rasvan kantasoluilla. hBMSC 6/16 linjan soluilla myös pmaxGFP plasmidin fluoresenssin intensiteetti vähentyi testausjakson aikana enemmän kuin millään muilla tutkittavilla näytteillä.

Elektroporaatiossa käytetty solumäärä oli huomattavasti suurempi kuin muissa menetelmissä, sillä voimakas sähkövirta vaikuttaa merkittävästi solujen elinkykyyn. Suuremman solumäärän ansiosta jäljelle jääneiden solujen määrä saadaan pysymään halutulla tasolla. Kontrollisolut on myös saaneet elektroporaatio-käsittelyn, joten solumääriä voidaan verrata niiden ja transfektoitujen näytteiden välillä. Kummallakaan solutyypillä kontrollisolujen määrä ei merkitsevästi poikennut transfektoitujen solujen määrästä. Transfektoituneita luuytimen kantasoluja oli näytteissä vain vähän näkyvissä, mikä voi johtua epätarkkuuksista solujen irrotuksessa tai maljauksessa. Kuvausten välissä näytteille ei vaihdettu välillä uutta mediumia ja se voi myös osittain selittää solumäärän vähenemistä. Actin Chromobody värjää solun aktiinitukirangan vihreäksi fluoresoivalla proteiinilla, pmaxGFP sen sijaan värjää epäspesifisesti myös muita solun rakenteita. Fluoresoivissa signaaleissa värin intensiteetti katoaa aina ajan kuluessa, lisäksi näytteiden väri haalistuu niiden altistuessa valolle. Vaikka näytteet on pyritty suojaamaan valolta mahdollisimman hyvin koko testauksen ajan, ne altistuvat useaan kertaan mikroskoopin kameran valolle. Joten on mahdollista, että fluoresoiva väri vähentyy jo pelkän kuvausvalon takia huomattavasti kuuden testauspäivän aikana. Osa kuvista on jouduttu ottamaan kirkkaammalla valistuksella, jotta on saatu näkyviin himmeästi fluoresoivia soluja.

Tulosten perusteella voidaan sanoa, että elektroporaatio on onnistunut molemmilla käytetyillä kantasolutyypeillä hyvin. Samalla on myös testauksessa huomattu, että transfektoidun plasmidin teho säilyy soluissa ainakin testatun 6 päivän ajan lähes kaikissa näytteissä hyvin. Tämä mahdollistaa testata transfektoituneita soluja vielä jatkotutkimuksissa, joita ei kuitenkaan tämän työn puitteissa ollut mahdollista tehdä. Elektroporaatiolla on saatu transfektiossa hyviä tuloksia ja menetelmää

voidaan pitää tehokkaana. Menetelmän haittapuolina ovat kallis laitteisto ja suuret käyttökustannukset. Elektroporaatio vaatii suuren solu- ja reagenssimäärän ja myös sitä kautta menetelmän käyttöhintaa nousee. Toisaalta tehokkuus elektroporaatiossa on niin hyvää, että se kompensoi kallista hintaa. Lisäksi elektroporaatiossa on eniten mahdollisuuksia säätää olosuhteita kuten esimerkiksi, reagenssien pitoisuuksia, solumäärää ja laitteiston ohjelmaa. Työ on haastavampi toteuttaa verrattuna muihin transfektio- menetelmiin, sillä työvaiheita on huomattavasti enemmän kuin muissa tämän työn kokeellisissa osissa. Se myös tarkoittaa, enemmän mahdollisia virhelähteitä tuloksiin.

Fysikaalisessa menetelmässä sähkövirran avulla saadaan aikaiseksi solukalvoon aukkoja ja DNA pääsee kulkeutumaan soluun helposti. Toisaalta liian suuri sähkövirta myös aiheuttaa solukalvon repeytymistä. Kemiallisissa menetelmissä kuljettajareagenssi pystyy samalla myös suojelemaan herkkää DNA:ta ennenaikaiselta hajoamiselta, mutta elektroporaatiossa DNA on vapaana ja voi hajota helpommin. (Ding ym. 2017, Kurita ym. 2016) Myös elektrolyysistä johtuvat pH:n muutokset aiheuttavat solukuolemia, joita voidaan yrittää ehkäistä vaihtamalla puskuriliuosta. (Potter & Herrer 2003). Elektroporaation tehokkuuden on verrattu olevan jopa virusten kanssa samaa luokkaa, mutta tämä menetelmä on halvempi, helpompi toteuttaa ja turvallisempi. Elektroporaatiota halutaan edelleen kehittää tehokkaammaksi transfektio-menetelmäksi, mutta sitä rajoittaa tietämys yksityiskohdista jotka liittyvät DNA:n kulkeutumiseen solukalvon kautta tumaan. (Chicaybam ym. 2017, Ding ym. 2017, Kurita ym. 2016)

6.5 siRNA menetelmän toimivuus transfektiossa

Näytteiden tarkastelua varten transfektoidut siRNA solut fiksattiin 48 tuntia transfektioista ja niiden aktiinitukiranka värjättiin falloidinilla (punainen väri) ja tumat DAPI:lla (sininen väri). Rasvan kantasoluja toisiinsa verrattaessa huomataan, että hASC 4/15 linjan solut ovat selvästi kapeampia kuin hASC 7/12 linjan solut. Myös solujen tumat ovat pienemmät 4/15 linjan soluilla. Solujen määrät ovat kaikissa näytteissä pysyneet hyvänä, eikä suuria eroja havaita transfektoituneiden ja kontrollisolujen määrissä. Kuvassa 37. nähdään, että CIP2A_90.3 transfektio on aiheuttanut selvää muutosta hASC 4/15 linjan soluille. Soluja on tässä näytteessä paljon vähemmän kuin muissa rasvan kantasolujen näytteissä, lisäksi solujen tumat eivät erotu rakenteesta selkeästi. hASC 4/15 linjan solujen muoto CIP2A_90.3 näytteissä on kuitenkin muuten hyvin samanlainen kuin linjan muissa siRNA näytteissä. Kaikki rasvan kantasolut on käsitelty ja värjätty samaan aikaan, mutta esimerkiksi värjäysreagenssien huono sekoitus, on voinut aiheuttaa osaan näytteistä heikomman värisignaalin. Solujen määrään ja morfologiaan on voinut myös vaikuttaa solujen sijainti kuoppalevyllä, sillä

huolellisesta maljauksesta huolimatta solunäytteet olivat usein kerääntyneet kuoppalevyn keskelle. Tiiviissä rykelmässä eläneet solut ovat voineet jäädä hiukan pienemmiksi verrattuna vähän sivummassa ja suuremmassa tilassa eläneisiin soluihin.

Luuytimen kantasoluja on maljattu 5,000 solua/kuoppalevy, ja niiden määrä transfektion jälkeen on kaikissa näytteissä pienempi kuin rasvan kantasoluilla. Kaikkein vähiten soluja oli nähtävillä hBMSC 6/16 linjan näytteissä. Sillä linjalla oli myös havaittavissa, että kaikissa transfektoiduissa näytteissä solumäärä oli pienempi kuin kontrollisoluissa (kuva 38.). Myös solujen koko on hiukan pienempi transfektoiduissa soluissa verrattuna kontrollinäytteisiin. Näiden kuvien perusteella ei voida sanoa, johtuvatko eroavaisuudet reagenssien vai transfektion aiheuttamasta stressistä soluille. Kuvassa 39. ei nähdä selkeää eroa transfektointuneiden ja kontrollinäytteiden välillä solujen määrässä. hBMSC 7/16 linjan soluilla CIP2A_90.2 ja CIP2A_90.3 näytteissä solumäärät ovat vähentyneet verrattuna kontrollisoluihin. 10x suurennoksessa nähdään, että CIP2A_90.3 on aiheuttanut hiukan muutosta solujen aktiinitukirangan morfologiassa, sillä ne ovat vähän pienempiä muihin näytteisiin verrattuna. Punaiset pisteet jotka ovat havaittavissa useissa näytteissä erityisesti 20x suurennuksella kertovat, että solun aktiinisäikeet ovat osittain katkenneita.

siRNA-transfektiota voidaan pitää onnistuneena ainakin kyseisellä CIP2A siRNA:lla sekä rasvan- että luuytimen kantasoluilla, molemmilla solutyypeillä on edellytyksiä jatkotutkimuksia varten. Onnistumista osoittavat Western blot kuvat 34. ja 35. sekä falloidiinilla värjätyt näytteet kuvissa 36-39. Solujen kasvatus oli onnistunut hyvin, sillä soluja oli nähtävissä paljon ja värjäys oli myös onnistunut. Kaikki solut on pidetty samoissa olosuhteissa ja eroavaisuuksien voidaan olettaa johtuvan CIP2A:n transfektioista. Menetelmää voidaan myös testata muuttamalla siRNA ja RNAiMax reagenssien pitoisuuksia ja tarkastella tuleeko transfektion onnistumisessa eroja. Menetelmä vaatii useita työvaiheita, varsinkin western blottauksessa, ja lopputuloksen tarkasteluun menee useita päiviä.

Sairauksia joihin siRNA menetelmällä odotetaan tulevaisuudessa löytyvät apua ovat esimerkiksi, syöpien lisäksi erilaiset autoimmuuni- ja infektiosairaudet (Lakshmikuttyamma ym. 2014). siRNA menetelmän ansiosta voidaan hoitaa sairauksia hiljentämällä viallisen geenin vaikutus ja poistamalla oireita. Menetelmä ei paranna sairautta eikä poista virheellistä geeniä, mutta sen avulla sairaan elämänlaatua voidaan parantaa poistamalla oireita. Yksi rajoittava tekijä siRNA applikaatioiden käytössä on niiden haasteet solunsisäisessä kulkeutumisessa. siRNA on polyanioninen molekyyli ja sen kulkeutuminen solukalvon läpi tarvitsee jonkin kuljettajareagenssin. Lisäksi vapaa siRNA kehossa on hyvin epävakaa ja helposti hajoava sekä verenkierrossa, että solun sisällä. Siksi ennen kuin siRNA menetelmää voidaan hyödyntää sairauksien hoidossa, pitää löytää halpa ja turvallinen

reagenssi joka pystyy suojelemaan siRNA molekyyliä ennenaikaiselta hajoamiselta. Molekyylin on löydettävä kohdesolut ja päästävä hajoamatta niiden sisään. siRNA menetelmässä käytettäviä kuljettajareagensseja on useita kaupallisia vaihtoehtoja, joista lupaavimmat ovat erilaiset lipidit, polymeerit ja epäorgaaniset nanopartikkelit. Toisaalta sekä lipidit että tietyt polymeerit voivat aiheuttaa toksisia vaikutuksia eri solulinjoissa. (Lakshmikuttyamma ym. 2014, Xiao ym. 2015, Xu ym. 2016).

6.6 siRNA-transfektion toimivuuden tarkistus Western blottauksella

Tässä työssä Western blot menetelmä on otettu käyttöön siRNA-transfektioiden tarkastamista varten. Menetelmän tarkoituksena on todentaa, onko siRNA-transfektio toiminut halutulla tavalla. Western blottaus on paljon käytetty proteiinianalyysimenetelmä, joka on hyvin optimoitavissa ja siksi luotettava menetelmä proteiinien tarkasteluun. SiRNA-transfektio on erityinen verrattuna muihin tässä työssä käytettäviin menetelmiin, sillä se estää proteiinin muodostumisen liittymällä mRNA:n kanssa kaksijuosteiseksi kompleksiksi. Tätä kaksijuosteista kompleksia ei voida lukea ribosomeissa ja proteiinia ei pääse muodostumaan. Lisäksi kaksijuosteinen RNA hajotetaan myös soluissa nopeasti. Kontrollinäyte ja transfektoitavat näytteet ovat kaikki käsitelty samoissa olosuhteissa samalla tavalla lukuun ottamatta plasmidin lisäystä. Kontrollinäytteiden kohdalla oleva paksu juova kuvissa 34. ja 35. kertovat, että CIP2A proteiinia esiintyy rasvan kantasoluissa normaalisti paljon. Rasvan kantasoluilla on transfektiolla saatu alennettua CIP2A proteiinin pitoisuutta soluissa n. 97 % verrattuna CIP2A näytteitä scrambled näytteisiin. Vastaavasti luuytimen kontrollinäytteissä on jo lähtökohtaisesti vähemmän CIP2A proteiinia kuin rasvan kantasolujen näytteissä ja transfektion avulla CIP2A proteiinin tuotanto on saatu käytännössä kokonaisuudessaan estettyä luuytimen kantasoluilla. Rasvan kantasoluja tarkastaessa voidaan havaita, että testaus on onnistunut hieman paremmin 4/15 linjan soluilla. Voidaankin sanoa, että siRNA-transfektio on toiminut hyvin molemmilla solutyypeillä.

Kuvissa 34. ja 35. näkyy tutkittavan CIP2A proteiinijuosteen alla hyvin vahva epäspesifinen juoste. Rasvasolujen kohdalla 7/12 linjan kohdalla juosteet näytteiden kohdalla ovat selkeämmin erotettavissa kuin 4/15 linjan soluilla. Vastaavasti myös luuytimen kantasolujen kohdalla tunnistamaton juoste on voimakkaammin näkyvissä 6/16 linjan soluilla. Toisaalta epäspesifisen juosteen kohdalla ei ole eroavaisuuksia kontrollisolujen ja transfektoitujen näytteiden välillä, joten voidaan ainakin olettaa, ettei kyseinen juoste aiheudu hajonneesta CIP2A proteiinista. Parempaa erottelua varten voisi kokeilla ajamalla näytteitä geelissä pienemmällä jännitteellä pidempään. Yksi vaihtoehto optimointiin voi olla testata menetelmää eri vasta-aineilla. Transfektoidessa soluja siRNA

reagenssilla pitoisuuksien on oltava kohdillaan, sillä transfektiossa käytettävät reagenssit voivat olla korkeina pitoisuuksina haitallisia soluille (Xiao ym. 2015).

Rasvan kantasoluissa on lähtökohtaisesti n. 25 % enemmän aktiinia kuin luuytimen kantasoluissa. Tämä on laskettu Image J-ohjelmalla kuvien 34. ja 35 perusteella. Aktiinia käytetään tässä tapauksessa osittain verrokkina havainnoimaan, ettei siRNA käsittely ole muuten häirinnyt solun toimintaa. Aktiinin esiintyvyys soluissa on solukohtaista ja sen pitoisuudesta ei voida suoraan sanoa onko työ onnistunut vai ei. Aktiinipitoisuuksia voidaan kuitenkin osittain verrata keskenään ja kuvasta 34. on laskettu, että hASC 7/12 linjan soluissa olisi noin 30 % enemmän aktiinia kuin hASC 4/15 linjan soluissa. Luuytimen kantasolujen kesken näyttäisi olevan enemmän eroavaisuuksia linjojen välillä, sillä hBMSC 7/16 linjan soluissa on aktiinia vain 1/3 verrattuna hBMSC 6/16 linjan soluihin. Aktiinin tasaiset pitoisuudet solunäytteissä molemmissa solutyypeissä kertovat, että siRNA-transfektio on onnistuttu kohdistamaan vain haluttuun CIP2A proteiinin tasoon.

6.7 Yleinen pohdinta

Solujen maljaus on kriittinen ja monellakin tapaa ratkaiseva tekijä työn onnistumisessa. Esimerkiksi kuoppalevyn pohja voi olla tyypiltään sellainen, että solut pakkaantuvat helposti kuopan keskelle, jolloin ne ovat hyvin tiiviisti toistensa kanssa, eivätkä solut silloin pääse kasvamaan ja levittäytymään kovin hyvin. Ahtaassa kasvustossa myös niiden kyky ottaa vierasta DNA:ta sisäänsä voi olla rajoitettua. Fysikaalisten ja kemiallisten menetelmien etuina on että, ne ovat usein helpommin säädeltävissä bioyhteensopiviksi ja pystyvät siirtämään useammanlaisia biomolekyylejä myös vaikeasti transfektoitaviin soluihin (Ishiguro 2017). Kemiallista ja fysikaalista menetelmää käytettäessä täytyy varmistaa, että DNA on suojattuna ja pystyy kulkeutumaan solukalvon läpi, vapautumaan sytosolissa ilman ennenaikaista hajoamista ja toimimaan solussa halutulla tavalla.

Menetelmien tutkimisessa on taustalla useita tekijöitä ja yksi niistä on saada tarkasteltua solujen rakennetta, migraatiota ja levittäytymistä elävissä soluissa. Elävistä soluista saadaan pienemmällä solumäärällä enemmän ja monipuolisemmin tietoa verrattuna aikaisempiin menetelmiin, joissa solut fiksattiin tietyn ajanjakson jälkeen, ja voitiin tarkastella vain yhtä tilannetta kerrallaan. Toinen syy transfektoiden testaukseen on, että halutaan saada pysyvää muutosta solujen genomissa, jolloin ne jakaantuessaan siirtäisivät transfektoitun DNA:n tytärsoluille. Näin ollen geenien toimintaa ja solujen käyttäytymistä voitaisiin tarkastella vielä monipuolisemmin. Solujen käyttäytymisen tunteminen on aina tarpeen kehiteltäessä uusia sovelluksia tai menetelmiä, esimerkiksi perinnöllisissä sairauksissa, joihin ei ole saatavissa lääkkeitä pidentämään ja parantamaan elämänlaatua.

7. Johtopäätelmät

Kaikki tässä työssä rasvan ja luuytimen kantasoluilla testatut transfektio-menetelmät toimivat, mutta menetelmien välillä on suuria eroja. Transfektio- pidempiaikaista vaikutusta testattiin ainoastaan elektroporaatiolla, ja se tuotti lupaavia tuloksia, vaikkakin fluoresoiva väri vähentyi näytteissä testauksen aikana. Solujen fiksaaminen vähensi kaikissa tapauksissa fluoresoivien solujen määrää, joten sen tarpeellisuutta sekä suoritustapaa on edelleen harkittava. Parhaimmat tulokset on saatu elektroporaatiolla ja Lipofectamine3000 reagenssilla. Elektroporaatio on kallis ja vaatii suuren solumäärän, mutta se on tehokas menetelmä solujen transfektioon, ja sen olosuhteita voidaan myös eniten optimoida. Lipofectamine3000 reagenssi on myös hyvin lupaava menetelmä, vaikka siinäkin reagenssikustannukset ovat melko korkeat. Sekä FuGENE että kalsiumfosfaattisaostus menetelmät vaativat vielä mahdollisesti olosuhteiden optimointia, jotta transfektioista saataisiin tehokkaampaa. siRNA-transfektio on myös onnistunut tässä työssä, mutta Western blot tuloksissa on mukana hyvin vahva epäspesifinen tuntematon proteiini. Sen lisäksi, että menetelmissä oli eroavaisuuksia, niin myös eri solulinjat toimivat eri tavoin testauksen aikana. Molemmilla solutyypeillä, rasvan ja luuytimen kantasoluilla, oli havaittavissa, että menetelmästä riippuen toinen solulinja tuotti parempia tuloksia. Kuitenkaan mitään systemaattista epäonnistumista ei ollut havaittavissa käytetyillä solulinjoilla, sillä kaikki solutyypit tuottivat hyviä tuloksia jollain käytetyllä menetelmällä. Taulukossa 5. on tehty lyhyt yhteenveto käytettyjen menetelmien ominaisuuksista.

Taulukko 5. Käytettyjen menetelmien yhteenveto

Menetelmä	Edut	Haitat
FuGENE	<ul style="list-style-type: none">• Helppokäyttöinen	<ul style="list-style-type: none">• Kalliit reagenssikustannukset• Huono tehokkuus
Lipofectamine	<ul style="list-style-type: none">• Helppokäyttöinen• Tehokas	<ul style="list-style-type: none">• Ei sovellu kaikille solutyypeille• Kalliit reagenssikustannukset
Kalsiumfosfaatti-saostus	<ul style="list-style-type: none">• Edulliset käyttökustannukset• Soveltuu kaikille solutyypeille• Mahdollistaa pysyvän transfektion	<ul style="list-style-type: none">• Matala tehokkuus• Pieni optimaalinen pH:n käyttöalue (+/- 0,1 pH muutokset)
Elektroporaatio	<ul style="list-style-type: none">• Erittäin hyvä tehokkuus• Soveltuu useille solutyypeille• Soveltuu pysyvään transfektioon	<ul style="list-style-type: none">• Vaatii paljon työvaiheita• Kalliit käyttökustannukset• Suuri solukuolleisuus
siRNA	<ul style="list-style-type: none">• Käyttökohteissa paljon valinnanvaraa• Hyvä tehokkuus	<ul style="list-style-type: none">• Kalliit reagenssikustannukset

8. Lähteet

- Abdul Halim NS, Fakiruddin KS, Ali SA, Yahaya BH. (2014). A comparative study of non-viral gene delivery techniques to human adipose-derived mesenchymal stem cell. *Int J Mol Sci.* Aug 26;15(9):15044-60.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, 2009. *Essential Cell Biology*, third edition
- Antczak C, Mahida J, Singh C, Calder P, Djaballah H. (2014). A high content assay to assess cellular fitness. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2014 Jan;17(1):12-24.
- Arjmand B, Goodarzi P, Mohamadi-Jahani F, Falahzadeh K, Larijani B. (2017). Personalized Regenerative Medicine. *Acta Med Iran.* 2017 Mar;55(3):144-149.
- Arous C. & Halban P. (2015). The skeleton in the closet: actin cytoskeletal remodeling in β -cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Oct 1;309(7): E611-20
- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M. and Ghaemi N. (2012). A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology.* 2012 Oct; 64(5): 523–540.
- Bang O, Kim E, Cha J, Moon G. (2016). Adult Stem Cell Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *J Stroke.* 18(3):256-266.
- Batard P, Jordan M, Wurm F. (2001). Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene.* May 30;270(1-2):61-8.
- Bays J. & DeMali K. (2017). Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Aug;74(16):2999-3009.
- Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL. (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol.* 2001 May 14;153(4):881-8.
- Bernabé-García Á, Liarte S, Moraleda JM, Castellanos G, Nicolás FJ. (2017) Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration. *Sci Rep.* 2017 Nov 10;7(1):15262.
- Bhattacharya I, Ghayor C, Weber FE. (2016). The Use of Adipose Tissue-Derived Progenitors in Bone Tissue Engineering. *Transfus Med Hemother.* 336-343.
- Boyette L. & Tuan R. (2014). Adult Stem Cells and Diseases of Aging. *J Clin Med* 3(1): 88-134.
- Brown M, Perrotta J, Turner C. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol.* 1996 Nov;135(4):1109-23.
- Burridge K. & Guilluy C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 2016 Apr 10;343(1):14-20.
- Calderwood D. (2004). Integrin activation. *J Cell Sci.* 2004 Feb 15;117(Pt 5):657-66.

- Cardarelli, F, Digiacomo L, Marchini C, Amici A, Salomone F, Fiume G, Rossetta A, Gratton E, Pozzi D, Caracciolo G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* 6, 25879.
- Cheng L, Zhang K, Wu S, Cui M, Xu T. (2017). Focus on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Opportunities and Challenges in Cell-Free Therapy. *Stem Cells Int.* 2017;2017:6305295.
- Chernousova S. & Eppler M. (2017). Live-cell imaging to compare the transfection and gene silencing efficiency of calcium phosphate nanoparticles and a liposomal transfection agent. *Gene Ther.* May;24(5):282-289.
- Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Gomez Limia CG, Redondo P, Lira C, Paraguassú-Braga F, Meira De Vasconcelos ZF, Barros L, and Hernán Bonamino MH. (2016). An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 4: 99.
- Ciuffi S, Zonefrati R, Brandi ML. (2017). Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017 May-Aug;14(2):217-226.
- Dai Ru, Zongjie Wang, Roya Samanipour, Kyo-in Koo, and Keekyoung Kim. (2016). Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells International.*
- Ding X, Stewart M, Sharei A, Weaver JC, Langer RS, Jensen KF. (2017). High-throughput Nuclear Delivery and Rapid Expression of DNA via Mechanical and Electrical Cell-Membrane Disruption. *Nat Biomed Eng.* 2017;1. pii: 0039.
- Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. (2016). Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother.* 43(4):268-274.
- Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010; 26:315-33.
- Ghosh R, Gilda J, Gomes (2104) The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics.* 2014 Oct; 11(5): 549–560.
- Guo L, Wang L, Yang R, Feng R, Li Z, Zhou X, Dong Z, Ghartey-Kwansah G, Xu M, Nishi M, Zhang Q, Isaacs W, Ma J, Xu X. (2017). Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi J Biol Sci.* Mar; 24(3): 622–629.
- Gupta M, Doss B, Lim CT, Voituriez R, Ladoux B. (2016). Single cell rigidity sensing: A complex relationship between focal adhesion dynamics and large-scale actin cytoskeleton remodeling. *Cell Adh Migr.* 2016 Sep 2;10(5):554-567.
- Hanna H, Franck M. Andre, and Lluís M. (2017). Electrical control of calcium oscillations in mesenchymal stem cells using microsecond pulsed electric fields. *Stem Cell Res Ther.* 8: 91.
- Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. (2018). Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 25;19(2). pii: E360.
- Ishiguro K, Watanabe O, Nakamura M, Yamamura T, Matsushita M, Goto H, Hirooka Y. (2017). Combinational use of lipid-based reagents for efficient transfection of primary fibroblasts and hepatoblasts. *Biotechniques.* Jul 1;63(1):37-39.

- Jacobsen L, Calvin S, Colvin K, Wright M. (2004). FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods*. 2004 Jun;33(2):104-12.
- Jacobsen L, Calvin S, Lobenhofer E. (2009). Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *Biotechniques*. 2009 Jul;47(1):617-24.
- Jensen K, Anderson JA, Glass EJ. (2014). Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2014 Apr 15;158(3-4):224-32.
- Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. (1996). Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation. *Nucleic Acids Res* 24 (4): 596-601.
- Jordan M, Wurm F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*. Jun;33(2):136-43.
- Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y, Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grønman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kähäri VM, Westermarck J. (2007). CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):51-62.
- Khanna A, Böckelman C, Hemmes A, Junttila MR, Wiksten JP, Lundin M, Junnila S, Murphy DJ, Evan GI, Haglund C, Westermarck J, Ristimäki A. (2009). MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Jun 3;101(11):793-805.
- Kingston R, Chen C, Rose J. (2003). Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol*. 2003 Aug;Chapter 9:Unit 9.1.
- Kurita H, Takao Y, Kishikawa K, Takashima K, Numano R, Mizuno A. (2016). Fundamental study on a gene transfection methodology for mammalian cells using water-in-oil droplet deformation in a DC electric field. *Biochem Biophys Rep*. 2016 Aug 12;8:81-88.
- Lakshmikuttyamma A, Sun Y, Lu B, Undieh AS, Shoyele SA. (2014). Stable and efficient transfection of siRNA for mutated KRAS silencing using novel hybrid nanoparticles. *Mol Pharm*. 2014 Dec 1;11(12):4415-24.
- Liu J, Jones K, Sumer H, Verma P. (2009). Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. *Mol Reprod Dev*. 2009 Jun;76(6):580-6.
- Liu X, Cao W, Qin S, Zhang T, Zheng J, Dong Y, Ming P, Cheng Q, Lu Z, Guo Y, Zhang B, Liu Y. (2017). Overexpression of CIP2A is associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Signal Transduct Target Ther*. 2017 May 26;2:17013.
- MacQueen L, Sun Y, Simmons CA. (2013). Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms. *J R Soc Interface*. 2013 May 1;10(84):20130179.
- Mahmood T. & Yang P-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. 4(9): 429–434.

- Mathieu P. & Lobo E. (2012). Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Dec;18(6):436-44.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):56-68.
- Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. (2017). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A.* 2017 Oct 26.
- Palmer AK & Kirkland JL. (2016). Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Exp Gerontol.* p. 97-105.
- Patrikoski M, Sivula J, Huhtala H, Helminen M, Salo F, Mannerström B, Miettinen S. (2014). Different culture conditions modulate the immunological properties of adipose stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Oct;3(10):1220-30.
- Prieto P, Fernández-Velasco M, Fernández-Santos ME, Sánchez PL, Terrón V, Martín-Sanz P, Fernández-Avilés F, Boscá L. (2016). Cell Expansion-Dependent Inflammatory and Metabolic Profile of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol* 7:548
- Pérez-Silos V, Camacho-Morales A, Fuentes-Mera L. (2016). Mesenchymal Stem Cells Subpopulations: Application for Orthopedic Regenerative Medicine. *Stem Cells Int* 2016:3187491.
- Potter H. & Heller R. (2003). Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol.* 2003 May.
- Rao S, Morales AA, Pearse DD. (2015). The Comparative Utility of Viromer RED and Lipofectamine for Transient Gene Introduction into Glial Cells. *Biomed Res Int.* 2015: 458624.
- Roato I, Alotto D, Belisario DC, Casarin S, Fumagalli M, Cambieri I, Piana R, Stella M, Ferracini R, Castagnoli C. (2016). Adipose Derived-Mesenchymal Stem Cells Viability and Differentiating Features for Orthopaedic Reparative Applications: Banking of Adipose Tissue. *Stem Cells Int.* 4968724.
- Sándor GK, Numminen J, Wolff J, Thesleff T, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Seppänen R, Miettinen S, Rautiainen M, Öhman J. (2014). Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Apr;3(4):530-40.
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Eppe M. (2006). Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials.* Jun; 27 (16):3147-53.
- Sringer T, Yue Y. (2013). *How Free Cationic Polymer Chains Promote Gene Transfection*, Springer Science & Business Media, s 1-22.
- Vériter S, André W, Aouassar N, Poirel HA, Lafosse A, Docquier PL, Dufrane D. (2015). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cell Therapy: Safety and Feasibility in Different "Hospital Exemption" Clinical Applications. *PLoS One.* 2015 Oct 20;10(10):e0139566.
- Xiao AS, Lightcap ES, Bouck DC. (2015). Acoustic Liquid Handling for Rapid siRNA Transfection Optimization. *J Biomol Screen.* 2015 Sep;20(8):957-64.

Xu X, Li Z, Zhao X, Keen L, Kong X. (2016). Calcium phosphate nanoparticles-based systems for siRNA delivery. *Regen Biomater.* Sep;3(3):187-95.

Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, and Geiger B. (2004). Hierarchical assembly of cell–matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions* Vol 32, part 3.

Zhang X, Xu B, Sun C, Wang L, Miao X. (2015). Knockdown of CIP2A sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin: an in vitro study. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Sep 15;8(9):16941-7.

Promega: <https://fi.promega.com> (luettu 20.9.17)

<http://patents.com/us-7479573.html> 3.1.2017

<http://dharmacon.gelifesciences.com/uploadedFiles/Resources/effective-sirna-controls-technote.pdf> (luettu 22.9.17)

Kuva 1. Muokattu lähteestä: Variola F, Brunski JB, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A. (2010). Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale.* 2011 Feb;3(2):335-53.

Kuva 2. Tiedot katsottu lähteestä: www.chromotek.com

Kuva 3. Tiedot katsottu lähteestä: <http://bio.lonza.com/go/op/90>

Kuva 4. Muokattu lähteestä: <https://www.ozbiosciences.com/content/14-Lipofection-liposomal-transfection-delivery-system>

Kuva 5. Muokattu lähteestä:
[https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_\(OpenStax\)/12%3A_Modern_Applications_of_Microbial_Genetics/12.1%3A_Microbes_and_the_Tools_of_Genetic_Engineering](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_(OpenStax)/12%3A_Modern_Applications_of_Microbial_Genetics/12.1%3A_Microbes_and_the_Tools_of_Genetic_Engineering)

Kuva 6. Muokattu lähteestä: <https://www.quizover.com/microbiology/section/gene-guns-microbes-and-the-tools-of-genetic-engineering-by-openstax>

Kuva 7. Muokattu lähteestä: <http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/protein-blotting-methods?ID=LUSPPSESH>

Kuva 8. Muokattu lähteestä: https://www.elabscience.com/western_blot-introduction_and_principles_of_western_blot-306.html